

Publikationen

In diesem Projekt sind folgende Publikationen entstanden:

Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H (2010) Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*, 31:2964-75.

Krifka S, Frank EM, Petzel C, Spagnuolo G, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H (2010) Resin monomer-induced activation of mitogen-activated protein kinases in vitro. *J Dent Res* (www.dentalresearch.org).

Krifka S, Frank EM, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H (2010) Time-dependent activation of MAP kinases by a dental resin monomer. *Arch Pharmacol*, 381, Suppl., 70 (333).

Schweikl H, Frank EM, Krifka S, Petzel C, Eckhardt A, Hiller KA, Schmalz G (2009) TEGDMA-induced activation of MAP kinases in murine macrophages. *J Dent Res* (www.dentalresearch.org).

INHALTSVERZEICHNIS

	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
1	EINLEITUNG	6
1.1	Zytotoxizität zahnärztlicher Komposite und ihrer Monomere	6
1.1.1	Mechanismen der Zytotoxizität zahnärztlicher Monomere	8
1.2	Mitogen- aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	11
1.2.1	Allgemeines	11
1.2.2	Aktivierung von MAPK durch ROS	12
1.2.3	MAPK und die zentralen Reaktionen des zellulären Immunsystems	13
1.2.4	MAPK und die Regulation des Zellzyklus	14
1.2.5	MAPK und Apoptose	16
1.2.6	Die Aktivierung von MAPK durch dentale Monomere	17
2	FRAGESTELLUNG	19
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Material	20
3.1.1	Chemikalien	20
3.1.2	Materialien	22
3.1.3	Geräte	23
3.1.4	Antikörper	24
3.1.4.1	Primäre Antikörper	24
3.1.4.2	Sekundäre Antikörper	25
3.1.5	Lösungen, Medien und Puffer für die Zellkultivierung	25
3.1.6	Lösungen und Puffer für Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot	28

3.2	Methoden	31
3.2.1	Zellkultur	31
3.2.2	Herstellung der Expositionslösungen	32
3.2.3	Versuchsdurchführung	32
3.2.3.1	Ernten der Zellen nach Exposition	32
3.2.3.2	Lyse der Zellen	33
3.2.4	Proteinbestimmung	33
3.2.5	SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese	34
3.2.5.1	Übertragung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	36
3.2.6	Nachweis von Proteinen auf Membranen durch Immunfärbung	37
3.2.6.1	Immunfärbungen	37
3.2.6.2	Nachweis durch ECL	38
3.2.7	Strippen von Blotmembranen	38
3.2.8	Densitometrie und Bilddarstellung	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Aktivierung von MAP-Kinasen durch Lipopolysaccharid	40
4.1.1	Aktivierung von p38 durch LPS	40
4.1.2	Aktivierung von ERK1/2 durch LPS	41
4.1.3	Aktivierung von JNK durch LPS	42
4.2	Aktivierung von MAPK durch TEGDMA	42
4.2.1	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38	43
4.2.1.1	Die Aktivierung von p38 nach kurzen Expositionszeiten	43
4.2.1.2	Die Aktivierung von p38 nach mittleren Expositionszeiten	44
4.2.1.3	Die Aktivierung von p38 nach langen Expositionszeiten	45
4.2.2	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2	46
4.2.2.1	Die Aktivierung von ERK1/2 nach kurzen Expositionszeiten	46
4.2.2.2	Die Aktivierung von ERK1/2 nach mittleren Expositionszeiten	47
4.2.2.3	Die Aktivierung von ERK1/2 nach langen Expositionszeiten	48

4.2.3	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK	50
4.2.3.1	Die Aktivierung von JNK nach kurzen Expositionszeiten	50
4.2.3.2	Die Aktivierung von JNK nach mittleren Expositionszeiten	51
4.2.3.3	Die Aktivierung von JNK nach langen Expositionszeiten	52
5	DISKUSSION	54
5.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	54
5.1.1	Aktivierung von MAPK durch das zahnärztliche Monomer TEGDMA	55
5.2	Aktivierung von MAPK durch LPS und das dentale Monomer TEGDMA	56
5.2.1	Aktivierung von p38 durch TEGDMA	57
5.2.2	Aktivierung von ERK1/2 durch TEGDMA	58
5.2.3	Aktivierung von JNK durch TEGDMA	59
5.3	Auswirkung der Aktivierung von MAPK durch LPS / TEGDMA in Pulpazellen	60
5.4	Die Induktion von Apoptose in RAW264.7 Makrophagen	61
5.5	Schlussfolgerung	65
6	ZUSAMMENFASSUNG	66
7	LITERATURVERZEICHNIS	69
8	DANKSAGUNG	76
9	LEBENS LAUF	77

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Strukturen ausgewählter Monomere (methylsubstituierte Acrylate) der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite auf Acrylatbasis.	7
Abb. 2:	Struktur ringöffnender Silorane, die aus der Verknüpfung von Siloxanen mit Oxiranen entstehen (modifiziert nach Weinmann <i>et al.</i> , 2005).	7
Abb. 3:	Modell der Wirkung der Monomere Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) in Zellen.	10
Abb. 4:	Aktivierung der MAPK p38 in RAW 264.7 Makrophagen durch LPS.	40
Abb. 5:	Aktivierung von ERK1/2 in RAW 264.7 Makrophagen durch LPS.	41
Abb. 6:	Aktivierung von JNK in RAW 264.7 Makrophagen durch LPS.	42
Abb. 7:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW 264.7 Makrophagen.	44
Abb. 8:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW 264.7 Makrophagen.	45
Abb. 9:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW 264.7 Makrophagen.	46
Abb. 10:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW 264.7 Makrophagen.	47
Abb. 11:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW 264.7 Makrophagen.	48
Abb. 12:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW 264.7 Makrophagen.	49
Abb. 13:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW 264.7 Makrophagen.	50
Abb. 14:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW 264.7 Makrophagen.	51
Abb. 15:	Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW 264.7 Makrophagen.	52
Abb. 16:	Induktion von Apoptose in RAW-Makrophagen.	62

1 Einleitung

1.1 Zytotoxizität zahnärztlicher Komposite und ihrer Monomere

Komposite für die zahnmedizinische Füllungstherapie bestehen aus einer organischen Matrix sowie anorganischen Füllstoffen. Weitere Komponenten sollen die sehr hohe Viskosität der Matrixsubstanzen senken, die Polymerisationsreaktion der Monomere der organischen Matrix starten (chemisch oder photochemisch), diese beschleunigen oder hemmen und die Stabilität sowie die Farbe der Werkstoffe bewahren. Erst die mengenmäßige Zusammensetzung und ihr Polymerisationsgrad der Komponenten der organischen Matrix bestimmen die Materialeigenschaften zahnärztlicher Komposite. Der Erfolg der klinischen Anwendung eines Komposites wird zum einen von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Werkstoffs bestimmt, andererseits ist aber auch ihre biologische Verträglichkeit relevant.

Die organische Matrix der Komposite auf der Basis von Acrylaten enthält vor allem methylsubstituierte Acrylate und Substanzen für ihre kontrollierte Polymerisation (Abb.1) [Peutzfeldt, 1997; Rueggeberg, 2002]. Eine neue Generation dentaler Komposite basiert auf der Verwendung ringöffnender Substanzen als Komponenten der organischen Matrix, beispielsweise Silorane, die dazu beitragen sollen, die Polymerisationsschrumpfung zu vermindern (Abb. 2) [Weinmann *et al.*, 2005].

Die Polymerisationsreaktion der Komponenten der organischen Matrix verläuft selbst unter optimalen Bedingungen der klinischen Anwendung nie vollständig, so dass stets nicht - polymerisierte Restmonomere im Komposit verbleiben [Geurtsen, 2000; Michelsen *et al.*, 2003]. Diese Substanzen werden auch unter klinischen Bedingungen ausgelaugt und können auf benachbarte Gewebe wie die der Pulpa oder der Mundschleimhaut wirken. So wurden die Monomere TEGDMA und HEMA in humanem Speichel detektiert und eine Diffusion physiologisch relevanter Konzentrationen dieser Monomere über Dentintubuli in Pulpagewebe festgestellt [Noda *et al.*, 2002; Michelsen *et al.*, 2007].

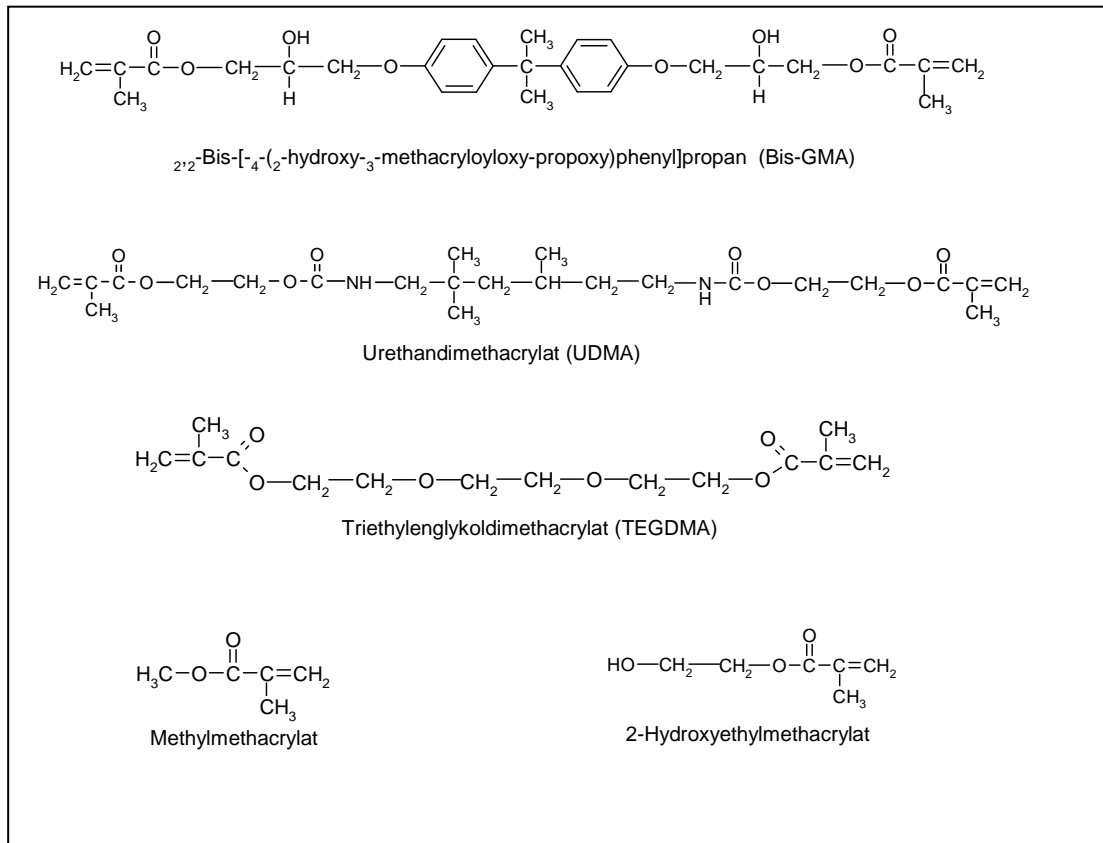


Abb.1: Strukturen ausgewählter Monomere (methylsubstituierte Acrylate) der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite auf Acrylatbasis.

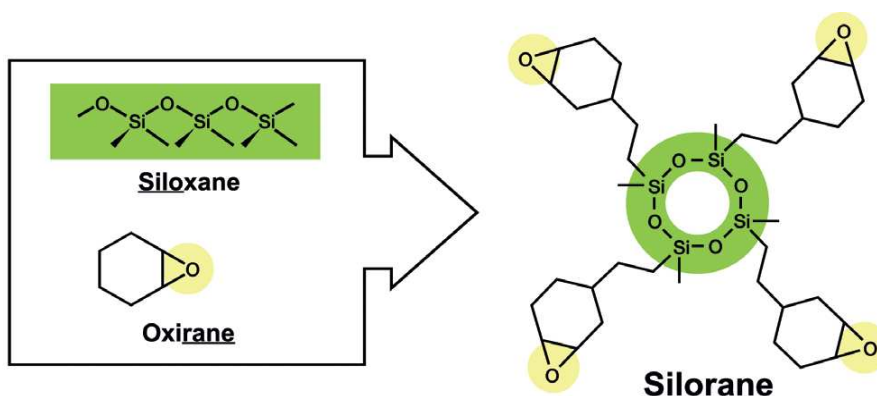


Abb.2: Struktur ringöffnender Silorane, die aus der Verknüpfung von Siloxanen mit Oxiranen entstehen (modifiziert nach Weinmann *et al.*, 2005).

Als zytotoxische Bestandteile der Werkstoffe wurden die überwiegend als Basismonomere und Comonomere verwendeten Dimethacrylate identifiziert (Hanks *et al.*,

1991; Geurtsen *et al.*, 1998; Thonemann *et al.*, 2002). Es wurde diskutiert, dass toxische Konzentrationen von Monomeren im Gewebe der Zahnpulpa von der Behandlungsdauer und -Intensität sowie von der Dicke des Dentins und dessen Permeabilitätseigenschaften abhängen (Gerzina und Hume, 1996; Hume und Gerzina, 1996; Murray *et al.*, 2002; Schmalz *et al.*, 2002). Struktur-Aktivitätsuntersuchungen haben gezeigt, dass Acrylate toxischer sind als Methacrylate und difunktionelle Moleküle wie Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) sind wirksamer als monofunktionelle Moleküle wie etwa 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) (Yoshii, 1997).

1.1.1 Mechanismen der Zytotoxizität zahnärztlicher Monomere

Die Extrakte zahnärztlicher Komposite und Dentinadhäsive sind abhängig von den experimentellen Parametern, der Herstellung von Prüfkörpern (Polymerisation, Liegezeit, Expositionsdauer, etc.) und dem Grad der Freisetzung von Restmonomeren unterschiedlich zytotoxisch (Geurtsen *et al.*, 1999; Schweikl *et al.*, 2005; Demirci *et al.*, 2008). Die intrazelluläre Verarmung an Glutathion (GSH), ein Tripeptid, ist in vielen Fällen ein erster Indikator der Toxizität vieler reaktiver organischer Substanzen (Watson *et al.*, 2003). So war auch die Zytotoxizität des Comonomers TEGDMA mit einem sehr raschen Abfall der intrazellulären Konzentration von GSH und parallel dazu einem Anstieg der Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden (Engelmann, 2004; Stanislawski *et al.*, 2003). Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), Ascorbat oder Trolox (Vitamin E) schienen die Erzeugung von Zellschäden durch TEGDMA, HEMA oder auch PMMA zu verhindern (Stanislawski *et al.*, 2003, Walther *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2008). NAC schützte sogar Pulpazellen gegen die Toxizität von PMMA in vivo (Paranjpe *et al.*, 2008).

Der Hinweis auf die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxylradikalen als Signalmoleküle für die Induktion des physiologischen Zelltods (Apoptose) markiert ebenfalls einen neuen Ansatz in der Diskussion der Mechanismen zytotoxischer Effekte. Apoptose ist ein

aktiver, energieverbrauchender Prozess mit deutlichen morphologischen Veränderungen betroffener Zellen und Gewebe (Majno und Joris, 1995; Nicholson und Thornberry, 2003; Zhiotovskiy, 2004). Zellen in Apoptose erhalten die Integrität der Zellmembran, allerdings wird der Verlust der Asymmetrie in der Orientierung der Zellmembran an der Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Zelloberfläche erkennbar (Kerr *et al.*, 1972; Searle *et al.*, 1982). Im Gegensatz zu Zellen in Apoptose werden Zellen in Nekrose größer (Oncosis), die Integrität der Zellmembran geht verloren und Zellinhalte werden freigesetzt. Lange wurde Nekrose als ein passiver und unkontrollierter Prozess betrachtet. Es gibt aber inzwischen Hinweise darauf, dass auch Nekrose ähnlich wie die Apoptose über ein enges Netz von Signaltransduktionswegen reguliert werden kann (Kroemer *et al.*, 2009).

Das zelleigene Programm zur Regulation des Zelltods via Apoptose wird wohl auch durch zahnärztliche Komposite, ihre Monomere oder deren Metabolite induziert. So erzeugten Extrakte von Kompositwerkstoffen und Polymethacrylaten Apoptose in ganz unterschiedlichen Zelllinien (Cimpan *et al.*, 2000a; Cimpan *et al.*, 2000b; Gough und Downes, 2001; Gough *et al.*, 2002; Quinlan *et al.*, 2002; Spagnuolo *et al.*, 2004a). Für das Monomer HEMA, das Comonomer TEGDMA und das Basismonomer Bis-GMA wurde über die Induktion von Apoptose in primären humanen Gingiva - und Pulpa-zellen berichtet (Janke *et al.*, 2003; Engelmann *et al.*, 2004; Spagnuolo *et al.*, 2004b; Spagnuolo *et al.*, 2004c; Paranjpe *et al.*, 2009).

Die Aktivierung zellulärer Signaltransduktionswege über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) durch ROS scheint bei der Induktion von Apoptose durch HEMA und TEGDMA eine zentrale Rolle zu spielen (Samuelsen *et al.*, 2007; Spagnuolo *et al.*, 2008; Eckhardt *et al.*, 2009). Monomere können auch zentrale Leistungen von Zellen des Immunsystems inhibieren, beispielsweise die MAPK-abhängige Expression von Oberflächenantigenen oder die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach Stimulation der Zellen mit einem Endotoxin (LPS) pathogener Organismen (Eckhardt *et al.*, 2009).

Andererseits ist auch die Induktion genotoxischer Effekte durch TEGDMA und HEMA nachgewiesen (Schweikl *et al.*, 2006). Deshalb ist auch denkbar, dass eine erhöhte

Menge an ROS oxidative DNA-Schäden erzeugt, die zu DNA-Strangbrüchen führen. Als Folge davon könnte über eine Reihe von Signalmolekülen das Tumorsuppressorprotein p53 aktiviert und der Zellzyklus verzögert werden. Die Aktivierung von p53 könnte schließlich Apoptose induzieren. Diese Diskussion ist in einem einfachen Modell der intrazellulären Wirkung der Monomere illustriert (Abb. 3).

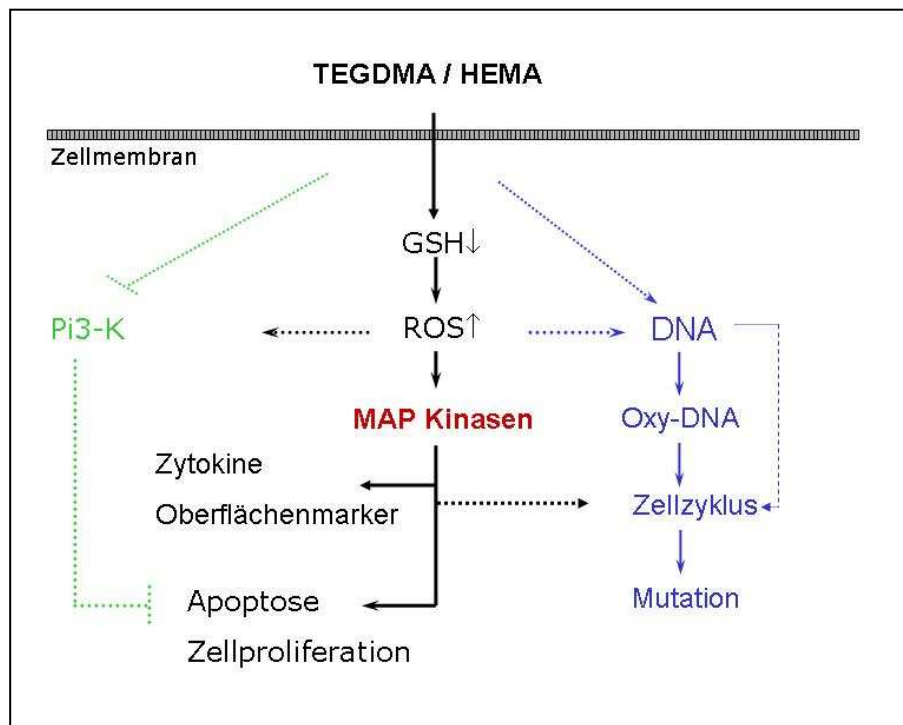


Abb.3: Modell der Wirkung der Monomere Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) in Zellen.

Beide Monomere reduzieren intrazellulär den Gehalt an Glutathion (GSH) und parallel dazu steigt die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dieser oxidative Stress induziert oxidative DNA-Schäden und aktiviert Signaltransduktionsketten wie etwa Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPK). Die Aktivierung von MAPK beeinflusst die Bildung von Zytokinen und Oberflächenmarkern oder verändert die Zellvitalität (Apoptose) und die Zellproliferation.

1.2 Mitogen- aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

1.2.1 Allgemeines

Eukaryontische Zellen verfügen über eine Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktionswege zur Steuerung der zellulären Homöostase. Sie werden meist durch Rezeptoren an der Zelloberfläche oder intrazelluläre Sensoren, die verschiedene interne und externe Signale (*stressors*) erkennen, angestoßen und bewirken so verschiedene zelluläre Reaktionen wie Zellproliferation oder Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder die Freisetzung von Zytokinen oder leiten Apoptose ein (Takeda *et al.*, 2008). Die Kaskade der MAPK ist eine dieser Signalketten (Hayakawa *et al.*, 2006). Nach dem Erkennen eines Mitogens durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche, beispielsweise *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), erfolgt die Weiterleitung des Signals über drei Stufen von MAPK (Beutler, 2004), die mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MAPKKK), mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MAPKK) und schließlich die MAPK selbst. JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), p38 MAPK und ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) sind gut untersuchte Untergruppen der großen Familie der in allen Eukaryonten evolutionär konservierten MAPK (Matsuzawa und Ichijo, 2005).

Diese Signalwege sind strukturell ähnlich, funktionell jedoch sehr verschieden. So dient nach übereinstimmender Ansicht der Weg über ERK1/2 überwiegend der Regulation der Zellproliferation und des Zellzyklus. Im Unterschied dazu werden JNK und p38 vor allem durch eine Reihe sehr verschiedener Stressoren aus der Umwelt aktiviert, zu denen osmotischer Schock, UV-Strahlung, Hitzeschock, oxidativer Stress (ROS), Stimulierung über Fas und proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha (*tumor necrosis factor*) und IL-1 (Interleukin-1) oder IL-6 zählen (Tibbles und Woodgett, 1999). Beispielsweise ist das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) ein sehr wirksamer Aktivator von JNK und p38, aber auch von ERK1/2. Wegen der Aktivierung durch Stressfaktoren werden JNK und p38 auch gemeinsam als SAPK (*stress-activated protein kinases*) bezeichnet (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Jede MAPK-Familie steuert bestimmte Zielgene und hat unterschiedliche Aufgaben,

trotzdem gibt es ausgeprägte Interaktionen zwischen den einzelnen MAPK (*crosslinks*), so dass man von einem Netzwerk und nicht von unabhängigen parallelen Systemen ausgeht (Lavoie *et al.*, 1996; Matsuzawa und Ichijo, 2005; Junttila *et al.*, 2008).

MAPK steuern Zielgene *downstream*. So sind aktuell Transkriptionsfaktoren wie etwa Sp1, E2F, Elk-1 oder *activator protein 1* (AP-1) als Ziele von MAPK beschrieben (Murphy und Blenis, 2006; Katz *et al.*, 2007). Die Untereinheiten von AP-1, c-Jun und c-Fos, werden von MAPK unter Stressbedingungen durch Phosphorylierung aktiviert (Takeuchi *et al.*, 2006). Auch die Transkriptionsfaktoren ATF2 und ATF3 gehören zur Familie der AP-1 Proteine und können unter Stressbedingungen durch die Stress-kinasen (SAPK) JNK und p38 aktiviert werden. Für eine detaillierte Diskussion von Struktur und Funktion dieser Transkriptionsfaktoren wird hier auf spezielle Übersichtsartikel verwiesen (Hai und Hartman, 2001; Morton *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008).

1.2.2 Aktivierung von MAPK durch ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können intrazellulär als *second messenger* fungieren und Signale übertragen, die beispielsweise von Wachstumsfaktoren ausgehen. So ist eine bestimmte Menge an ROS im physiologischen Gleichgewicht für die Steuerung der Zellproliferation notwendig, wirkt also mitogen über die Aktivierung der MAPK ERK1/2 (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Eine durch Umweltfaktoren gestörte ROS-Homöostase kann jedoch den Zelltod via Apoptose einleiten. Oxidativer Stress führt zur Aktivierung von ERK1/2, wobei Rezeptoren für Wachstumsfaktoren eine ganz zentrale Funktion übernehmen. EGF (*epidermal growth factor*) oder PDGF (*platelet-derived growth factor*) etwa werden als Reaktion auf eine erhöhte Menge an H₂O₂ und UV-Strahlung phosphoryliert und können - vermittelt über Ras, wiederum ERK1/2 aktivieren (Sachsenmaier *et al.*, 1994). ERK1/2 fungiert allgemein als anti-apoptotischer Regulator (Guyton *et al.*, 1996). JNK und p38 werden durch Stressfaktoren aus der Umwelt aktiviert, etwa durch Arsenit, Cadmium-

chlorid, UV- und Röntgenstrahlung oder allgemein durch oxidativen Stress (zusammengefasst in Matsuzawa und Ichijo, 2005).

Neuere Untersuchungen verweisen auf die mechanistische Verbindung zwischen der Produktion einer erhöhten Menge an ROS, der Aktivierung von Stresskinasen und der Induktion von Apoptose. Es ist bekannt, dass Antioxidantien und thiolreduzierende Substanzen wie N-Acetylcystein (NAC) und Dithiothreitol (DTT) oder auch experimentell überexprimierte antioxidative Enzyme wie die Mangansuperoxid-dismutase (SOD2) oder die Glutathione-S-transferase die durch Stresskinasen induzierte Apoptose hemmen (Maehara *et al.*, 2001; Townsend und Tew, 2003).

1.2.3 MAPK und die zentralen Reaktionen des zellulären Immunsystems

Monozyten oder Makrophagen dienen der Verteidigung gegen schädliche Fremdstoffe wie Chemikalien, Viren und Bakterien oder bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharid (LPS) (Janeway und Medzhitov, 2002). Diese Fremdstoffe werden von Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen erkannt. Die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) sind der wichtigste Teil der Perzeption und das Endotoxin LPS, ein Glycolipid der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, ist ihr momentan am besten untersuchter Ligand (Miyake, 2004). LPS bindet über das LBP (*LPS binding protein*) an das Oberflächenantigen CD14 (*cluster of differentiation 14*) und MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) an den Rezeptor TLR4. Dabei gilt in der Literatur CD14 als der klassische LPS-Rezeptor (Ulevitch, 1993). Das so aktivierte TLR4 aktiviert seinerseits MyD88-abhängige (*myeloid differentiation factor 88*) und MyD88-unabhängige Signalwege. Der MyD88-abhängige Weg induziert zunächst die Bildung eines Proteinkomplexes aus IRAK4/IRAK1/TRAF6 an TLR4 und infolgedessen werden über TRAF6 die MAP Kinasen, vor allem p38 und JNK, aktiviert. Die MAPK steuern dann koordiniert mit Transkriptionsfaktoren, beispielsweise NF- κ B, die spezifischen Reaktionen des angeborenen zellulären Immunsystems, zu denen die Freisetzung von Zytokinen oder die Expression von Oberflächenantigenen wie CD14 zählen (Lee und Kim, 2007). Zytokine sind Proteine, die auch der Kommunikation zwischen den

Zellen des Immunsystems dienen. Sie vermitteln unter anderem eine Entzündung und die darauf folgende Immunantwort. Wichtige Zytokine der angeborenen Immunantwort (*innate immunity*) sind beispielsweise TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 und IL-12 (Medzhitov und Janeway, 1997; Dong *et al.*, 2002). Die Wirkungen der einzelnen Zytokine sind sehr unterschiedlich. TNF- α und IL-1 fördern die entzündliche Immunantwort (proinflammatorische Zytokine), IL-6 stimuliert die Produktion von „akute-Phase-Proteine“ und rekrutiert Neutrophile, und IL-10 verhindert eine Überreaktion der Immunantwort (Männel und Echtenacher, 2000; Dong *et al.*, 2002; Hanada und Yoshimura, 2002). Während Zytokine nicht nur direkt von Zelle zu Zelle wirken, dienen Oberflächenproteine wie MHC-I, MHC-II, CD54, CD80 und CD86 dem direkten Zell-Zell-Kontakt (Banchereau *et al.*, 2000; Randolph *et al.*, 2008). Kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 erhöhen durch den Kontakt mit CD28 auf T-Zellen deren Aktivität (Dilioglou *et al.*, 2003).

Diese originär LPS-stimulierten Signalwege der Freisetzung von Zytokinen oder der Expression von Oberflächenantigenen können durch Fremdstoffe (Stressoren) - wie auch dentale Monomere - beeinflusst sein. So wurde berichtet, dass die Sekretion von TNF- α nach Stimulation mit LPS in zuvor mit TEGDMA und HEMA behandelten Monozyten stark inhibiert wurde (Noda *et al.*, 2003). Außerdem wurde eine starke Inhibition der Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-10 sowie der Expression einer ganzen Reihe von Oberflächenantigenen durch TEGDMA sowohl in LPS-stimulierten als auch in ansonsten unbehandelten Makrophagen nachgewiesen (Eckhardt *et al.*, 2009).

1.2.4 MAPK und die Regulation des Zellzyklus

Neben der Antwort auf verschiedene Arten von zellulärem Stress ist bekannt, dass die MAPK ERK1/2 und p38 als Regulatoren des Zellzyklus fungieren. ERK1/2 ist ein starker positiver Regulator des Zellzyklus und wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt meist über Tyrosinkinase-Rezeptoren und die Aktivierung von Ras, der MAPKK Raf-1 und der nachgeschalteten Aktivierung von

MEK1/2, für die bisher außer ERK1/2 keine weiteren Substrate bekannt sind (Chambard *et al.*, 2007). Die zentrale Funktion von ERK1/2 für die Zellproliferation wird auf verschiedenen Ebenen der zellulären Regulation deutlich, denn ERK1/2 reguliert eine Vielzahl von Komponenten, die für eine Zellteilung notwendig werden. Dazu gehören Metabolite für die Proteinsynthese, die DNA und die RNA-Synthese (Chambard *et al.*, 2007). Die Aktivierung von ERK1/2 ist vor allem für den Übergang aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus bedeutsam. ERK1/2 steuert die Synthese des Cyclin D1 auf der Transkriptionsebene in Koordination mit der aktivierten PI3-Kinase (Katz *et al.*, 2007). ERK1/2 reguliert ferner den Zellzyklus über die Bildung von Cyclin/CDK-Komplexen (Cyclin D1/CDK4). Dieser Komplex phosphoryliert seinerseits das Retinoblastomprotein (pRB), das dadurch seine wachstumshemmende Wirkung verliert und so die Expression der Cycline A und E in der späten G1-Phase des Zellzyklus fördert. Außerdem ist ERK1/2 wahrscheinlich an der Regulation des Übergangs von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus beteiligt (Garnovskaya *et al.*, 2004; Chambard *et al.*, 2007).

Im Unterschied zu ERK1/2 ist p38 ein negativer Regulator der Synthese von Cyclin D1 (Lavoie *et al.*, 1996; Chambard *et al.*, 2007). Dies bedeutet, dass ein hoher Anteil an phosphoryliertem p38 das Fortschreiten des Zellzyklus unterbindet - ein Vorgang, der durch die Zugabe des p38-Inhibitors SB203580 aufgehoben werden kann (Lavoie *et al.*, 1996).

Die beiden MAPK ERK1/2 und p38 steuern auch den Arrest des Zellzyklus in Folge von DNA-Schäden durch chemische und physikalische Agenzien (radioaktive und UV-Strahlung) (Tang *et al.*, 2002; Golding *et al.*, 2007). Für diese Art der zellulären Reaktion auf Stressoren der Umwelt ist die Interaktion mit den bekannten Kontrollmolekülen ATM und p53 notwendig und partiell nachgewiesen. So wurde ERK1/2 als Reaktion auf die Behandlung von Zellkulturen mit cis-Platin aktiviert und phosphorylierte seinerseits p53 *in vitro* (Persons *et al.*, 2000). Auch Adriamycin (ADR) sowie radioaktive und UV-Strahlung aktivierten ERK1/2. Die Interaktion mit ATM und p53 ist nicht eindimensional, denn Komponenten wie etwa das Zytostatikum Etoposid aktivierten ERK1/2 nur, wenn auch ATM aktiviert wurde, jedoch unabhängig von p53

(Tang *et al.*, 2002). ERK1/2 ist daher möglicherweise ein Zielmolekül von ATM. Es besteht aber auch die Verbindung zur Regulation von p53, denn die Aktivierung von ERK1/2 arretiert den Zellzyklus auch in Abhängigkeit von p53 (Woods *et al.*, 1997; Sewing *et al.*, 1997; Wu, 2004). Ferner initiieren leichte DNA-Schäden die Aktivierung von ERK1/2 in einem Signalweg, der zunächst im Arrest des Zellzyklus endet, schwere DNA-Schäden hingegen scheinen – vielleicht über die ERK1/2-Aktivierung, – die Apoptose einzuleiten (Tang *et al.*, 2002).

Auch p38 ist an der Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 beteiligt, die entweder direkt oder indirekt über MK-2 erfolgt. Als Reaktion auf DNA-Schäden durch cis-Platin oder UV-Strahlen wird p38 stark und dauerhaft aktiviert und führt letztlich zur Aktivierung von p53, wahrscheinlich über ein p18 Protein. Die Aktivierung von p38 und p53 erhöht seinerseits die Expression von p21, ein zentraler Inhibitor des Zellzyklus, vor allem in der G1-Phase. Allerdings ist die Funktion des p38 für die Hochregulierung von p21 nach radioaktiver Bestrahlung noch nicht geklärt (Cuadrado *et al.*, 2007). Es gibt inzwischen auch Hinweise darauf, dass p53-defiziente Zellen auf DNA-Schäden über die Aktivierung von ATM und ATR und einen daran gekoppelten MAPK p38/MK-2-Signalweg reagieren (Reinhardt *et al.*, 2007). Desweiteren sind für die Klärung der Funktion, der dem p38 nachgeschalteten Proteine MK-2, MK-3 oder auch MK-5 (*MAPK-activated protein kinases*) bezüglich der Regulation von Genexpression, Organisation des Zytoskeletts oder Zellproliferation noch Untersuchungen notwendig (Gaestel, 2006).

1.2.5 MAPK und Apoptose

Die drei MAPK ERK1/2, JNK und p38 regulieren auch diejenigen Signalwege, die Apoptose auslösen oder das Überleben von Zellen fördern, die besonderen Stressfaktoren ausgesetzt sind. Welche der MAP-Kinasen spezifisch Apoptose induziert ist wohl abhängig von den aktivierenden Faktoren, den betroffenen Zelltypen oder der Höhe und der Dauer des Stresses (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Beispielsweise führt der Entzug eines Wachstumsfaktors zur dauerhaften

Aktivierung von JNK und p38 sowie zur Inhibition von ERK1/2, und diese beiden Wirkungen induzieren Apoptose (Xia *et al.*, 1995). Obwohl allgemein angenommen wird, dass ERK1/2 die Zellproliferation und das Zellüberleben fördert und JNK/p38 nicht nur davon verschiedene sondern sogar entgegengesetzte Wirkung haben, darf man aufgrund neuerer Untersuchungen doch vermuten, dass auch JNK und p38 Funktionen für das Zellüberleben oder die Zelldifferenzierung haben (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Die Bildung von ROS scheint ein ganz wesentlicher Faktor für die Aktivierung von MAPK zu sein. So führt beispielsweise die Inhibition der Aktivierung von JNK/p38 durch eine Deletion von ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), eine MAPKKK oberhalb der SAPK, zur Resistenz gegen die Induktion von Apoptose durch oxidativen Stress (Matsuzawa *et al.*, 2002; Tobiume *et al.*, 2001). Thioredoxin (Trx), ein redox-sensitives und antioxidatives Protein ist ein negativer Regulator des ASK1-induzierten p38 Signalwegs ebenso wie die durch oxidativen Stress induzierbare dualspezifische Phosphatase 5 (DUSP5). DUSP5 und Trx inhibieren die durch oxidativen Stress induzierbare Apoptose (Saitoh *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 2001).

1.2.6 Die Aktivierung von MAPK durch dentale Monomere

Die derzeit verfügbaren wenigen Berichte über die Aktivierung von MAPK durch zahnärztliche Monomere spiegeln die Komplexität der Regulation von Apoptose wieder. HEMA und TEGDMA aktivieren wohl nach langen Expositionszeiten ERK1/2 in einer Zelllinie aus der Speicheldrüse. Außerdem sollten p38 und JNK durch HEMA, nicht jedoch durch TEGDMA aktivierbar sein (Samuelsen *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse wurden für einen Zeitpunkt - 6h nach Expositionsstart - ermittelt und sind daher nur bedingt aussagekräftig. Die TEGDMA-induzierte Apoptose in humanen Pulpazellen scheint nicht durch ERK1/2 vermittelt zu sein, weil die spezifische Inhibition dieses Signalwegs das Überleben TEGDMA-behandelter Zellen nicht verändert (Spagnuolo *et al.*, 2004). Die sehr rasche Aktivierung von ERK1/2 durch HEMA wurde jedoch in primären humanen Pulpazellen nachgewiesen. Eine reduzierte Zellvitalität nach Inhibition von ERK1/2 in Anwesenheit von HEMA verweist

darauf, dass ERK1/2 unter diesen Bedingungen eine anti-apoptotische Funktion übernimmt (Spagnuolo *et al.*, 2008). Außerdem schützte das Antioxidans N-Acetylcystein humane Monozyten vor zytotoxischen Effekten von TEGDMA und inhibierte die Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 nach langen Expositionszeiten (Eckhardt *et al.*, 2009).

Interessant ist auch die Beobachtung, dass die Expression von TRNX, ein negativer Regulator von Thioredoxin (Trx), und die durch oxidativen Stress induzierbare dualspezifische Phosphatase 5 (DUSP5) in den mit TEGDMA behandelten Zellkulturen auf der Transkriptionsebene inhibiert wurde (Schweikl *et al.*, 2008). Beide Moleküle sind an der Regulation der Aktivität von MAPK beteiligt. TRXN reguliert die Aktivität von Thioredoxin (Trx), das seinerseits als ein redox-sensitives und anti-oxidatives Protein ein negativer Regulator des ASK1-induzierten p38 Signalwegs ist. DUSP5 hingegen inaktiviert spezifisch die MAPK p38 (Schweikl *et al.*, 2008).

2 Fragestellung

Monomere dentaler Werkstoffe wie das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) wirken zytotoxisch und genotoxisch. Die Ergebnisse vieler überwiegend deskriptiv ausgerichteter Untersuchungen zeigten bisher eine Parallelität, jedoch nicht die ursächliche Verbindung dieser Effekte und möglicher zugrunde liegender Mechanismen. Es ist jedoch bekannt, dass dentale Monomere die zelluläre Redoxhomöostase durch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) stören. Wahrscheinlich sind ROS für die Induktion der zytotoxischen und genotoxischen Wirkung dentaler Monomere bedeutsam. Desweiteren darf man aus der bisher verfügbaren Literatur schließen, dass Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die zentrale Prozesse der Zellproliferation, des Zelltods, sowie der Immun- und Stressantwort regulieren, durch ROS aktiviert werden. Daher ist möglicherweise auch die Aktivierung von MAPK durch Phosphorylierung ein Mechanismus der Zytotoxizität dentaler Monomere.

Ziel dieser Untersuchungen war es daher, den Einfluss des Kunststoffmonomers TEGDMA auf die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK zu untersuchen. Im Einzelnen wurden folgenden Fragen experimentell bearbeitet:

1. Aktiviert oder inaktiviert TEGDMA die MAPK ERK1/2, p38 und JNK?
2. Wie ist die Kinetik dieser Aktivierung oder Inaktivierung?

Das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert bekanntermaßen die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38, ERK1/2 und JNK und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle verwendet. Sämtliche Experimente wurden mit murinen RAW264.7 Makrophagen durchgeführt. Diese Zellen sind gut charakterisiert und eignen sich für das Studium der genannten Fragestellung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid "Rotiphorese Gel "40 (29:1), Art#A515.1	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxiddisulfat), Art.95922	Roth, Karlsruhe
Blotting Membran (Nitrocellulose Protran BA83), Lot#7030005, Conv. No.7097683	Whatman GmbH, Dassel
Complete Mini, Best#11836153001, 25 Tabletten (Protease- Inhibitoren)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
C ₁₂ E ₁₀ , Best#P9769-5000, Decaethylene glycol monododecyl ether	Sigma, Taufkirchen
EDTA- Natrium- Salz, Lot#411472/2 20401, Best#03685	Fluka AG, Schweiz
ECL Plus Western Blotting Detection System, #RPN 2132	GE Healthcare Limited Buckinghamshire, UK
Essigsäure, Lot#K34277263 507	Merck, Darmstadt
Fetal Bovine Serum, Lot#07Q5364F	Gibco Invitrogen inc., U.S.A
Glycerin (4094.1000), 05 K 13393594	Merck, Darmstadt
Glycin, Cat#1.04201.1000	Merck, Darmstadt
Isopropanol, Lot.A0206967001	Acros Organics, U.S.A
HCl (rauchend, 37%) (UN1789)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (4933)	Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat (4873)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Lot#K 36524987 646	Merck, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer, Cat#161-0737	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Lipopolysaccharid- (E.coli), Lot#017 K 4098 L2880-10 mg in aqua dest.	Sigma, Taufkirchen
Precision Plus Protein Standards, Cat#161-0375	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Methanol (UN1230), Cat#1.06009.2511	Merck, Darmstadt
Milchpulver Blotting Grade, Art. T145.1	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (6404), Lot#K37352804	Merck, Darmstadt
NaF, Sigma, Best#S7920 – 100g, Natriumfluorid, 99%	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat (6406)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (6346)	Merck, Darmstadt
NP-40, Best#74385, Nonidet P 40 Substitute, 100%	Fluka AG, Schweiz
Natriumvanadat, Best#S6508 – 50 g	Sigma, Deisenhofen
Penicillin- Streptomycin (15140-122)	Gibco Invitrogen inc., U.S.A
Ponceau S Rot (258387 1086 K 3355), C.I.#27195	Fluka AG, Schweiz
SDS (Natrium- Dodecyl- Sulfat), Art#CN 30.3, Pellets (99%)	Roth, Karlsruhe
Roti Block, Art.#A151.1	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2g/l NaHCo3	Pan Biotech, GmbH, Aldenbach
Natriumpyruvat, Lot#311810	Gibco Invitrogen inc., U.S.A

Re-Blot Plus Mild Solution (10x), #2502, Lot#PS01436160	Chemicon, Millipore GmbH, Schwalbach
TEMED (N,N,N',N' -Tetraethylmethylen-diamid) Art.2367.3	Roth, Karlsruhe
TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat) (109-16-0)	Sigma, Deisenhofen
Tris- (hydroxymethyl) aminomethan-HCl, Cat#1.08387.005	Merck, Darmstadt
Trypsin 2,5 %	Gibco Invitrogen inc., U.S.A
Tween20, Best#P7949	Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.2 Materialien

Amersham Hyperfilm ECL (18x24cm)	GE Healthcare, München
Cellstar tubes 15 ml, Lot#07480196, Cat#188 271	Greiner, Frickenhausen
Falcon Zentrifugenröhrchen 50 ml, Art#0420705	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Filterpapier Mini Trans- Blot, Cat#1703932	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gel Loading Tips (Round Eppendorf), 200/pk. LC1010	Invitrogen, Carlsbad CA, U.S.A
Nitrocellulose, Protran	Whatmann GmbH, Dassel
pH- Indikatorstäbchen 1.09543, 60154137 (Spezialindikator pH6,5-10,0)	Merck, Darmstadt
Sterilfilter 0,2µm, Celluloseacetat, Lot#16534 070554	Sartorius, Göttingen

Gewebekulturschalen:

Bio-one Cellstar 145/20 mm, Art#639160	Greiner, Frickenhausen
Costar 96-Well-Platten, Cat#3598	Corning Incorporated, NY, USA
Kulturflaschen T162 (162 cm ²) (3151)	Corning Incorporated, NY, USA
Kulturflaschen T75 (75cm ²) (3376)	Corning Incorporated, NY, USA

3.1.3 Geräte

Mini Protean 3 Cell, Ser#679/29215	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Protean Tetra Cell, Ser#552BR0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Inkubationsschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Milli- QUF plus	Millipore GmbH, Schwalbach
Purification pak (Demineralisationspatrone) (CPMQ004D2)	Millipore GmbH, Schwalbach
pH-Meter Kalimatic	Knick, Berlin
Mikroskop Diavert, Ser#896460	Leitz, Wetzlar
Sartorius Analysenwaage MC 210P	Sartorius, Göttingen
Sartorius Waage 1404 MP 8, #3310033	Sartorius, Göttingen
Schüttler G.F.L.-3018	GFL - Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserbad Schüttler G.F.L.-1083	GFL-Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Schüttelgerät REAX 2000	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Magnetrührer, IKA- COMBIMAG RCT	IKA-Werk GmbH, Straufen

Mixing Block MB- 102 BIOER	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Spektralphotometer Infinite F200	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim
Sterile Werkbank Laminar Flow Gelaire, BSB4	Flow Laboratories, Merckenheim
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa/P Typ 4202 #2181	Hettich, Tuttlingen

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primäre Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Anti Active JNK	Rabbit Polyclonal Antibody, (pTPpY) (V7932)	Promega, Heidelberg
P38p	Rabbit Polyclonal Antibody, (Thr180/Tyr 182)-R; sc-17852-R (Lot#2907)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A
P38p	Rabbit Polyclonal Phosphospecific Antibody, (pTpY 180/182), SA-266	Epitomics, Burlingame, CA, U.S.A (Biomol, Hamburg)
P38p	Mouse Monoclonal Antibody (pT180/pY182), Clone 30 (61228)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
P38alpha	Monoclonal Antibody, p38 alpha/SAPK 2a, Mouse IgG1, Clone 27 (612169)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Phospho-p44/42 MAPK Antibody	Rabbit Polyclonal Antibody [Thr202/Tyr204] (9101)	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
P44/42 MAPK Antibody	Rabbit Polyclonal Antibody (9102)	Cell-Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Mouse Anti-Glycerin- Aldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	IgG1, Clone 6C5 (MAB374), Lot#0602023056	Chemicon, Millipore GmbH, Schwalbach

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Goat Anti- Rabbit (7074)	HRP-linked; Verdünnung 1:1000	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Goat Anti- Rabbit (1907)	Verdünnung 1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A
Goat Anti-Mouse (179-5616)	IgG, HRP-linked Verdünnung 1:3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.1.5 Lösungen, Medien und Puffer für die Zellkultivierung

Alle Lösungen und Puffer wurden steril filtriert. Jedem Liter Medium wurde Antibiotika in Form von 10 ml Penicillin-Streptomycin Stammlösung (100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin) vor Gebrauch zugegeben. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden für die Kultivierung der Zellen vor Gebrauch stets vorgewärmt.

Medium für RAW 264.7 Makrophagen

RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2 g/l NaHCO₃
+ 50 ml FBS (100%ig)
+ 5 ml Natriumpyruvat (100 ml)
+ 5 ml Penicillin /Streptomycin

10 x PBS-EDTA (Phosphatgepufferte Salzlösung mit EDTA) (pH 7.34)

80,0 g Natriumchlorid
2,0 g Kaliumchlorid
2,0 g Natriumhydrogenphosphat
9,1 g Kaliumhydrogenphosphat
2,0 g EDTA- Natriumsalz,
Titriplex III(C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈) x 2 H₂O
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1 x PBS-EDTA (Phosphatgepufferte Salzlösung mit EDTA)

100 ml 10 x PBS-EDTA
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

10 x CMF-PBS (Calcium- und magnesiumfreie phosphatgepufferte Salzlösung)

80,0 g Natriumchlorid
2,0 g Kaliumchlorid
9,1 g Natriumhydrogenphosphat
2,0 g Kaliumhydrogenphosphat
add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

Lysis-Puffer "8" für die Proteine (Zytosolfraktion)

Rezept:

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
0.1% NP-40 (100%)
0.1% C₁₂E₁₀
2 mM EDTA-Na
5 mM NaF
1 mM NaVO₄

Herstellung für 10 ml Lysis-Puffer:

500 µl 1 M 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
1500 µl 1 M 150 mM NaCl
10 µl 100% 0,1% NP-40
100 µl 10% C₁₂E₁₀
80 µl 238 mM 2 mM EDTA
250 µl 200 mM 5 mM NaF
100 µl 100 mM NaVO₄
add 5460 µl Aqua demin. (18 MΩcm)

Danach wurde 1x Complete Mini (Protease-Inhibitoren) für 30 min in 2 ml H₂O im Kühlschrank gelöst.

Trypsin 0,25 % in CMF-PBS

10 ml Trypsin 2,5%
90 ml 10 x CMF-PBS

3.1.6 Lösungen und Puffer für Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot

Probenauftragspuffer

Rezept:

950 µl 1 x Laemmli Sample-Buffer
50 µl β-Mercaptoethanol

10 x SDS-Laufpuffer

Rezept:

1,92 M Glycin
0,25 M Tris
1,00 % SDS

Herstellung für 1,0l:

144,13 g Glycin
30,29 g Tris
10,00 g SDS

Für die Elektrophorese (10 X) Laufpuffer 1:10 mit Wasser verdünnen.

6 x Laemmli-Puffer

Rezept:

350 mM Tris-HCl (pH 6,8)
10 % (w/v) SDS
30 % Glycerol
0,6 M DTT
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Herstellung für 1ml:

175,0 µl Tris-HCl (pH 6,8)

280,1 µl SDS

344,8 µl Glycerol

200,0 µl DTT

1 mg Bromphenolblau

Transfer-Puffer (TGM)

Rezept:

192 mM Glycin

25 mM Tris-HCl (pH 8,3)

10 % Methanol

Herstellung für 750 ml:

144,00 ml 1 M Glycin

18,75 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,3)

150,00 ml Methanol

437,25 ml Aqua demin. (18 MOhm)

Waschpuffer TBS (TRIS-gepufferte Salzlösung)

Rezept:

150 mM NaCl

25 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Herstellung für 1l:

150 ml 1 M NaCl

25 ml 1 M Tris, H₂NC (CH₂OH)₃

Add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

Waschpuffer TBST (TBS + 0,1% Tween 20)

Rezept:

150 mM NaCl
25 mM Tris-HCl (pH 7,4)
0.1 % Tween 20

Herstellung für 1l:

150 ml 1 M NaCl
25 ml 1 M Tris, $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$
1 ml Tween 20
add 1000 ml Aqua demin. (18 MΩcm)

Blocking-Puffer

5 % Milch in TBST

Herstellung:

2,5 g Milchpulver
50 ml TBST

Diese Lösung wird immer frisch angesetzt.

Roti-Block

Herstellung:

1 ml Roti-Block (10 X)
9 ml Wasser (reinst.
Millipore)

Diese Lösung wird immer frisch angesetzt.

Antikörper - Puffer

Für die Anwendung der primären Antikörper standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung.

AK in 5% Milch in TBST

Herstellung:

2,5 g Milchpulver

50 ml TBST

Dieser Puffer darf maximal dreimal benutzt werden; soll bei -20°C gelagert und nie im heißen, nur im lauwarmen Wasser aufgetaut werden.

AK in Roti-Block

Herstellung:

1 ml Roti-Block (10 X)

9 ml TBST

Diese Lösung wird immer frisch angesetzt.

Ponceau S

100 ml Essigsäure (5%ig)

2 g Ponceau S Rot

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RAW 264.7 Mausemakrophagen (ATCC TIB-71) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die Zellen wurden als Monolayer in RPMI Medium in T162-Flaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil bei 37°C im Inkubator kultiviert. Sobald ein subkonfluent Monolayer gewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden sie zuerst mit 10 ml 1 x PBS-EDTA gewaschen. Um die adhären Zellen abzulösen, exponierte man sie dann für 30

Sekunden 10 ml 0,25% in CMF-PBS gelöstem Trypsin und inkubierte sie für 3 - 5 Minuten im CO₂-Inkubator. Danach wurden die Zellen mit 10 ml Medium vom Flaschengrund abgespült und in Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Hämozytometer.

3.2.2 Herstellung der Expositionslösungen

Lipopolysaccharid (LPS) (10 mg) wurde in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots (1 mg/ml) tiefgefroren (-20°C). Für die Herstellung einer 0,1 µg/ml LPS-Lösung wurde die LPS-Stammlösung (1 mg/ml) zunächst mit Medium 1:10 verdünnt. Danach wurden von dieser 100 µg/ml LPS-Lösung 130 µl genommen und mit 129,870 ml Zellkulturmedium gemischt (Endvolumen 130 ml). Für die 0,5 µg/ml LPS-Lösung wurden 650 µl der 100 µg/ml LPS-Lösung mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 130 ml verdünnt. In ähnlicher Weise wurde eine 10 mM TEGDMA-Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 27,6 µl TEGDMA (3,81 Mol/l) mit Medium auf 10 ml Gesamtvolumen verdünnt. Aus dieser Stammlösung wurde dann wiederum mit Medium die Expositionslösung mit 3 mM TEGDMA erzeugt. Für die Herstellung einer Expositionslösung, die 0,1 µg/ml LPS und 3 mM TEGDMA enthielt, wurde ein entsprechendes Volumen einer 100 µg/ml LPS-Lösung in einer 10 mM TEGDMA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3 mM TEGDMA verdünnt.

3.2.3 Versuchsdurchführung

3.2.3.1 Ernten der Zellen nach Exposition

Die TEGDMA- und LPS-haltigen Medien (Kulturüberstände) wurden mit der Pipette abgenommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen auf Eis getrennt gesammelt. Die Zellen auf den Kulturschalen wurden dann mit 10 ml eiskaltem CMF-PBS gewaschen. Dieses Volumen wurde nun mit dem Medium im 50 ml Falcon-Röhrchen (auf Eis) vereint.

Die adhärenenten Zellen auf den Kulturschalen wurden inzwischen mit 3 ml eiskaltem PBS-EDTA (5 mM) (pH 7,2) überschichtet. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst, 10 ml PBS-EDTA zugeben und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen auf Eis überführen. Die Kulturschale wurde anschließend zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und die Pufferlösung ebenfalls mit der Zellsuspension im 50 ml Falcon-Röhrchen vereint. Danach wurden alle Röhrchen 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (Hettich Rotina 420R; Rotor 4723). Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in je 500 µl CMF-PBS resuspendiert; die Pellets, die aus den ursprünglichen Zellkulturüberständen gesammelt wurden, wurden mit den zugehörigen Pellets der adhärenenten Zellen vereint, nochmals mit CMF-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überständen wurden verworfen, die Zellpellets jedoch in 500 µl CMF-PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Cup überführt und 5 Minuten bei 2300 U/min (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Danach wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets abhängig von ihrer Größe in Lysepuffer (80 - 200 µl) resuspendiert.

3.2.3.2 Lyse der Zellen

Die Zellpellets wurden mit Lysis-Puffer „8“ gemischt, resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (10.000 U/min, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Das Lysat konnte in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und die Proteine durch Western-Blot-Analyse untersucht werden.

3.2.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten erfolgte nach dem Prinzip des Bicinchonic Acid Assay (BCA). Dabei ist die Biuret-Reaktion, die Reduktion eines Kupfer²⁺ Komplexes zu Kupfer¹⁺, mit der Fähigkeit von Bicinchonininsäure, mit Cu¹⁺-Ionen einen stabilen Farbkomplex zu bilden,

kombiniert (Smith *et al.*, 1985). BCA stellt einen violett-blauen Komplex mit Cu^{1+} in basischer Umgebung dar anhand dessen die Reduktion von basischem Cu^{2+} durch Proteine aufgezeigt werden kann.

Der kommerziell verfügbare Kit enthält ein Reagens A (B9643) (BCA, Natriumkarbonate, Natriumtartrate, Natriumbikarbonate in 0,1M NaOH, pH 11,25), ein Reagens B (C2284) (4% (w/v) Kupfer $^{2+}$ -Sulfat-Pentahydrat) sowie eine Protein-Standard-Lösung (P0914) (BSA = bovines Serumalbumin; 1 mg/ml BSA in 0,15 M NaCl mit 0,05% Natriumazid zur Konservierung). Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine Arbeitslösung hergestellt indem man Reagens A mit Reagens B verdünnte (1:50). Die Proteinbestimmung wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Proteinstandard BSA wurde im Lysepuffer in Konzentrationen von 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml in 25 μl in doppelten Ansätzen vorgelegt. Die Proteinproben wurden üblicherweise 1:10 und 1:20 mit H_2O verdünnt, und von jeder Verdünnung wurden zweimal je 25 μl pro Well pipettiert. Als Kontrolle (Blindprobe) wurde Puffer ohne Protein getestet.

Die Proteinproben (25 μl) wurden mit 200 μl der Arbeitslösung versetzt und auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gut gemischt. In den Proben mit hohem Proteingehalt war sofort eine Farbveränderung (lila) zu beobachten. Die Blindprobe behielt die grüne Farbe bei. Die Proben wurden nun im Wärmeschrank für 30 Minuten inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur gekühlt. Die Absorption der Lösungen in den einzelnen Wells wurde bei 562 nm mittels eines Spektralphotometers der Firma Tecan gemessen und die Proteinkonzentration im Vergleich mit einer Standardkurve, die anhand des BSA-Protein-Standards erstellt wurde, bestimmt.

3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit einem Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad) in einem Gel im elektrischen Feld, abhängig von ihrer Größe aufgetrennt. Unter Verwendung des diskontinuierlichen Verfahrens mit dem SDS-PAGE-System (Sodium-Dodecyl-

Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System) nach LAEMMLI (1970) wurde die Gelelektrophorese in vertikalen Gelkammern durchgeführt. Dieses diskontinuierliche Verfahren besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Der pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße der Gele kann variiert werden. Die Gele enthalten je nach gesuchtem Protein einen höheren oder niedrigeren Polyacrylamidanteil, d.h. je kleiner das gesuchte Protein, umso größer ist der Polyacrylamidanteil und desto engmaschiger ist das Gel.

Es wurde eine Gelapparatur der Firma Bio-Rad verwendet. Die Mengen für die Herstellung der Polyacrylamidgele sind auf die Größe dieser Gelapparatur abgestimmt. Für Sammel- und Trenngel in der angegebenen Konzentration wurden folgenden Substanzen und Volumina eingesetzt:

	<i>Komponenten</i>	<i>Sammelgel</i> 12%	<i>Trenngel</i> 12%
		Volumen	Volumen
40 %	Acrylamid (29:1 A, BIS A)	0,5 ml	3,3 ml
1,5 M	Tris (pH 8,8)	-----	2,75 ml
1,0 M	Tris (pH 6,8)	0,5 ml	-----
	Aqua pur	2,927 ml	4,780 ml
10 %	SDS	40 µl	110 µl
10 %	APS	30 µl	55 µl
	TEMED	3 µl	5,5 µl

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten mit dem Sammelgel nach Routineverfahren überschichtet. Die Proteinproben, üblicherweise 20 µg, wurden mit 1 x SDS-Auftragspuffer (15 µl 1 x Laemmli Sample Buffer) (Bio-Rad) mit Mercapthoethanol plus 15 µl Proteinprobe) versetzt, für 5 Minuten bei 95°C erhitzt (denaturiert) und danach sofort und für mindestens 10 Minuten auf Eis gestellt. Als nächstes wurden sie kurz bei 3.000 U/min (Eppendorftischzentrifuge) zentrifugiert, kurz

gemischt (Vortex) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde ein Precision Plus Protein Standard von Bio Rad verwendet.

Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (pH 8,02). Die Elektrophorese wurde in der Regel mit einer konstanten Spannung von 70 V/Gel gestartet (15 min). Nachdem die Probe vollständig ins Sammelgel eingelaufen war wurde die Spannung auf 110 V/Gel erhöht. Die Probenauftrennung erfolgte je nach Größe des nachzuweisenden Proteins für 1 - 1,5 Stunden.

3.2.5.1 Übertragung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Whatman) angepasster Größe erfolgte mit einer Apparatur der Firma Bio-Rad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) in einem Nassblot-Verfahren („Wet-Tank-Blotting“). Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst in einer Schale in Transferpuffer äquilibriert. Pro Blot wurden 2 Stück Whatmann-Papier vorbereitet. Diese wurden ebenfalls in Transferpuffer getaucht und auf die Blotapparatur gelegt. Anschließend folgten die Membran und das in Transferpuffer äquilibrierte Gel. Den Abschluss des „Sandwiches“ stellten mit Puffer getränkte Schwämme dar. Diese Kassette wurde dann in die mit kaltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer überführt. Die Blotkammer wurde während des Transfers mit Eiswasser in einem Kühlbehälter gekühlt. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA. Die reversible Ponceau-Färbung der Blotmembran mittels Ponceau S diente der Kontrolle des Proteintransfers.

3.2.6 Nachweis von Proteinen auf Membranen durch Immunfärbung

3.2.6.1 Immunfärbungen

In der Regel wurden unspezifische Bindungsstellen der Membranen in 5% Milch in TBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Tischschüttler blockiert, die Membran 2 x je 5 Minuten in TBST gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank mit einer Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert.

Die primären Antikörper Anti-phospho-p38 (1:1000; Santa Cruz; Sc-17852-R), Anti-p38 α (1:1250; clone 27/p38 α /SAPK2a; Nr.612168, BD Transduction Laboratories), Anti-phospho-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling Nr. 9101), Anti-ERK1/2 (1:1000; Cell Signaling Nr.9102) und Anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, 1:5000; nach langer Lagerzeit 1:1000; Chemicon (Millipore) clone 6C5) wurden dazu in 10 ml 5% Milch in TBST (im Falconröhrchen) pipettiert und vor dem Hybridisieren gründlich gemischt (Vortex). Weil das Blocking für den Nachweis von JNK1/2 in 5% Milch in TBS durchgeführt wurde, wurde die Membran danach 2 x in TBS gewaschen, anschließend jedoch mit Anti-ACTIVE JNK (1:5000 = 2 μ l auf 10 ml Gesamtvolumen; Promega, V7932) wieder in 5% Milch in TBST hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Lösung mit dem primären Antikörper entfernt und die Membran 3 x jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem auf die Spezies des primären Antikörpers abgestimmten sekundären Antikörper in 5% Milch in TBST (10 ml) inkubiert.

Für die Detektion von Anti-phospho-ERK1/2, Anti-ERK1/2, Anti-ACTIVE JNK wurde ein Goat-Anti-Rabbit-AK (1:1000; Nr. 7074, Cell Signaling) verwendet. Anti-phospho-p38 wurde mit einem Goat-Anti-Rabbit-AK (1:3000 = 3,3 μ l auf 10 ml) eines anderen Herstellers (Santa Cruz, Sc-2004) detektiert. Anti-p38 und Anti-GAPDH (1:3.000-10.000) hingegen wurden mit einem Goat-Anti-Maus IgG (H+L)-HRP (BioRad Nr. 170-6516) nachgewiesen. Nach der Inkubation der Membran mit dem sekundären

Antikörper wurde diese Lösung entfernt und die Membran 2 x jeweils 10 Minuten mit TBST, danach 1 x in PBS gewaschen.

3.2.6.2 Nachweis durch ECL

Peroxidasekonjugierte Sekundärantikörper wurden mit dem *ECL-System (enhanced chemiluminescence)* von GE Healthcare (ehemals Amersham Pharmacia) detektiert. Dazu wurde zunächst die zuletzt mit PBS gewaschene Membran mit der Proteinseite nach oben vorsichtig auf Zellstoff abgetupft. Die ECL-Reagentien A und B wurden im Verhältnis 1:1 oder 40:1 (ECL Plus) in einem Gesamtvolumen von 4 ml gemischt und so das vom Hersteller empfohlene Verhältnis von 0,125 ml/cm² Membran erhalten. Diese Lösung wurde nun auf die in einer Plastikbox aufbewahrte Membran gegeben. Daraufhin wurde die Box für eine Minute (5 min mit ECL-Plus) bei Raumtemperatur geschwenkt, um eine stets gleichmäßige Benetzung der Membranoberfläche zu gewährleisten. Danach entfernte man die Membran mit einer Pinzette aus der Box, schwenkte sie kurz, tupfte auf Zellstoff ab, legte sie in eine Entwicklungskassette (Hypercassette Amersham Biosciences) und bedeckte sie mit einer transparenten Folie frei von Luftblasen. Die Kassette wurde geschlossen, um die Membran samt Entwicklungslösung vor Licht zu schützen. In einer Dunkelkammer wurde nun ein lichtempfindlicher Film (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare) in die Kassette auf die Membran gelegt und für die gewünschte Zeit (zwischen wenigen Sekunden bis zu wenigen Minuten) exponiert. Nach der Exposition erfolgte die Fixierung und Entwicklung des Films in einer Entwicklungsmaschine.

3.2.7 Strippen von Blotmembranen

Die auf einer Membran gebundenen Antikörper konnten durch *stripping* bei Bedarf wieder entfernt werden. Dazu wurde die Membran 3 x 10 Minuten zunächst bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen, um die ECL-Entwicklungslösung zu entfernen. Nach dem Waschen wurde die Membran mit einer mit Wasser 1:10

verdünnten Stripplösung (Re-Blot Plus Mild Solution 10 x; Millipore-CHEMICON) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Stripplösung entfernt und die Membran kurz in Wasser, danach 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS stand die Membran für eine erneute Immunfärbung beginnend mit dem blocking wie oben beschrieben zur Verfügung.

Das Strippen von Blotmembranen wird vor allem für die Berechnung des Verhältnisses von phosphorylierter Form einer MAPK zur Gesamtmenge derselben MAPK besonders wichtig. Auf diese Weise werden beide Formen in einem Aliquot eines extrahierten und durch PAGE aufgetrennten Proteingemisches aus demselben Experiment auf derselben Membran nachgewiesen. Das Strippen von Membranen dient auch dazu, etwa durch den Nachweis konstitutiv exprimierter Proteine wie das GAPDH, auf der gestripten Membran zu zeigen, dass in jeder Spur dieselbe Menge an Protein separiert wurde und so Unterschiede in der Expression induzierbarer Proteine erkennbar werden.

3.2.8 Densitometrie und Bilddarstellung

Die entwickelten Filme mit den Signalen für die Expression der verschiedenen Formen der MAPK wurden mit einem Flachbettscanner gescannt und die Bilder im TIFF-Format (*tagged image file format*) gespeichert. Das Verhältnis zwischen den mittels Chemilumineszenz erzeugten positiven Signalen für phospho-p38 und p38, phospho-ERK1/2 und ERK1/2, sowie phospho-JNK und GAPDH unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen wurde dann nach Densitometrie mit einer Optimas Software (Optimas Corp. Version 6.2; Bothell, WA, USA) errechnet. Zur Darstellung der Blots in den Abbildungen dieser Arbeit wurden Ausschnitte aus den gescannten Bildern mit Adobe Photoshop CS gewonnen und schließlich in Microsoft Office Powerpoint 2003 bearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Lipopolysaccharid

Das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38, ERK1/2 und JNK bereits nach sehr kurzen Expositionszeiten (Matsuzawa und Ichijo, 2005). LPS wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um auch die Aktivierung der MAP-Kinasen in RAW 264.7 Makrophagen unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen zu prüfen. Außerdem sollten Extrakte aus Zellen, in denen MAPK durch LPS stimulierbar waren, in Experimenten mit dem zahnärztlichen Monomer TEGDMA als Positivkontrollen dienen.

4.1.1 Aktivierung von p38 durch LPS

In Anwesenheit von 0,1 µg/ml und 0,5 µg/ml LPS wird die MAPK p38 in RAW264.7 Makrophagen durch Phosphorylierung aktiviert (Abb. 4). Die höher konzentrierte LPS-Lösung aktiviert nach 15 Minuten Exposition p38 um den Faktor 4,8 und damit etwas stärker als 0,1 µg/ml LPS (Faktor 3,4) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (1), die nur sehr wenig phospho-p38 enthalten. Der Nachweis des Gesamt-p38 - phosphorylierte und nicht phosphorylierte Form - in den LPS-behandelten Kulturen und unbehandelten Kontrollen zeigt aber, dass in allen Bahnen die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

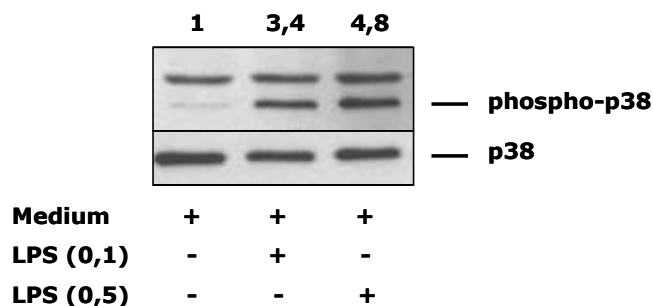


Abb. 4: Aktivierung der MAPK p38 in RAW264.7 Makrophagen durch LPS.

Die Zellen wurden 0,1 und 0,5 µg/ml LPS in Zellkulturmedium für 15 min exponiert. Danach wurden die Proteine (20 µg) der Zellextrakte elektrophoretisch getrennt, und phospho-p38 und p38 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (enhanced chemiluminescence) im Western Blot in LPS-stimulierten Zellen und unbehandelten Kontrollen (Medium) detektiert. Die Zahlen über den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an p38 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von p38. Die Proteinbande über derjenigen für phospho-p38 wird von dem hier verwendeten Antikörper unspezifisch erkannt.

4.1.2 Aktivierung von ERK1/2 durch LPS

LPS aktivierte auch die Phosphorylierung von ERK1/2 nach einer Exposition von 15 min (Abb. 5). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium) war in den mit LPS behandelten Zellkulturen ein verstärktes Signal für phospho-ERK1/2 erkennbar. Das Verhältnis der Aktivierung von phospho-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2 war nach Behandlung der Zellen mit 0,1 und 0,5 µg/ml LPS in etwa gleich (Faktor 5,0 und 4,5). Wiederum zeigte die gleichmäßige Färbung von Gesamt-ERK1/2 in den LPS-behandelten Kulturen und unbehandelten Kontrollen, dass in allen Bahnen die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

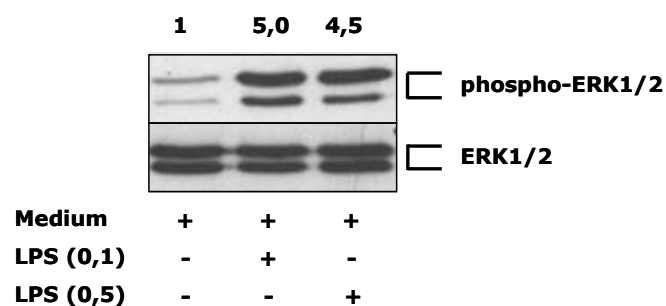


Abb. 5: Aktivierung von ERK1/2 in RAW264.7 Makrophagen durch LPS.

Die Zellen wurden 0,1 und 0,5 µg/ml LPS in Zellkulturmedium für 15 min exponiert. Danach wurden die Proteine (20 µg) der Zellextrakte elektrophoretisch getrennt, und phospho-ERK1/2 und ERK1/2 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (enhanced chemiluminescence) im Western Blot in LPS-stimulierten Zellen und unbehandelten Kontrollen (Medium) detektiert. Die Zahlen über den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an ERK1/2 und sind damit ein Maß für die Aktivierung. Zur Auswertung der Signalstärke wurde die jeweils obere der Doppelbanden von ERK1/2 verwendet.

4.1.3 Aktivierung von JNK durch LPS

Die MAPK JNK wurde in Zellkulturen, die für 15 Minuten mit LPS behandelt wurden ebenfalls aktiviert (Abb. 6). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Medium), in denen JNK auffallend schwach phosphoryliert war, erhöhten 0,1 µg/ml und 0,5 µg/ml LPS die Menge an phospho-JNK um den Faktor 5,1 und 7,1 verglichen mit unbehandelten Kontrollen (1), in denen phospho-JNK nur sehr schwach detektierbar war. Die Aktivierung von JNK wurde auf die Menge des konstitutiv exprimierten GAPDH bezogen, weil kein geeigneter Antikörper gegen Gesamt-JNK verfügbar war. Die gleichmäßige Intensität von GAPDH in den LPS-behandelten Kulturen und unbehandelten Kontrollen zeigte, dass die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

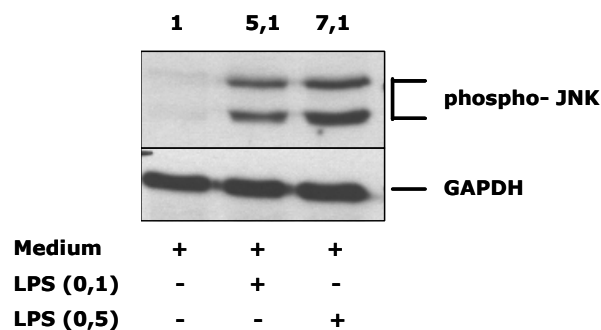


Abb. 6: Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen durch LPS.

Die Zellen wurden 0,1 und 0,5 µg/ml LPS in Zellkulturmedium für 15 min exponiert. Danach wurden die Proteine (20 µg) der Zellextrakte elektrophoretisch getrennt, und phospho-JNK und GAPDH wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (enhanced chemiluminescence) im Western Blot in LPS-stimulierten Zellen und unbehandelten Kontrollen (Medium) detektiert. Die Zahlen über den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form von JNK zur gesamten Menge an GAPDH. Sie sind damit ein Maß für die Aktivierung von JNK.

4.2 Aktivierung von MAPK durch TEGDMA

Die bisherigen Analysen zeigten, dass die aktivierten Formen der MAPK p38, ERK1/2 und JNK in RAW264.7 Makrophagen unter den hier definierten experimentellen Bedingungen nachweisbar sind. Nun sollte das hier gewählte Modell mit LPS (0,1

µg/ml) als interne Kontrolle auch dazu geeignet sein, eine Aktivierung der MAPK durch das dentale Monomer TEGDMA zuverlässig zu detektieren. Dazu wurde die Kinetik der Aktivierung von p38, ERK1/2 und JNK in Makrophagen nach Exposition gegen LPS, LPS plus 3 mM TEGDMA und 3 mM TEGDMA alleine untersucht. Diese Kombination von Substanzen wurde gewählt, weil aus eigenen Untersuchungen bekannt war, dass TEGDMA in Kombination mit LPS die Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen, eine charakteristische Leistung der RAW264.7 Makrophagen, nach einer Exposition von 6 Stunden, vor allem aber nach 24 Stunden inhibierte (Eckhardt *et al.*, 2009). Möglicherweise ist diese Inhibition der Makrophagenfunktion durch die Wirkung von TEGDMA auf die LPS-stimulierte Aktivierung von MAPK bedingt. Die Aktivierung der MAPK wurde nach einer Exposition gegen LPS und TEGDMA zwischen 15 Minuten und 24 Stunden bestimmt. Unterschiede in der Aktivierung der einzelnen MAPK zu verschiedenen Zeitpunkten könnten Hinweise darauf geben, welche MAPK mit welchen TEGDMA-induzierten zellulären Phänomenen, beispielsweise der Inhibition der Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen oder der Induktion von Apoptose, assoziiert ist.

4.2.1 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38

4.2.1.1 Die Aktivierung von p38 nach kurzen Expositionszeiten

LPS aktivierte wie gewohnt bereits nach 15 Minuten die MAPK p38 etwa um das 4-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen. LPS führte in der Kombination mit TEGDMA ebenfalls zu einer Aktivierung von p38 um den Faktor 3,0. TEGDMA alleine aktivierte p38 nach einer Exposition von 15 Minuten allerdings nicht (Faktor 0,9) (Abb. 7). Bereits nach 30 Minuten Exposition war die Aktivierung von p38 durch LPS hier nicht mehr nachweisbar (Faktor 0,7), allerdings aktivierte LPS in der Kombination mit TEGDMA (Faktor 2,9) die MAPK p38. In der nur mit TEGDMA behandelten Probe wurde p38 nun auch schwach aktiviert (Faktor 1,8). Gesamt-p38 wurde unter sämtlichen Bedingungen gleichmäßig stark exprimiert (Abb. 7).

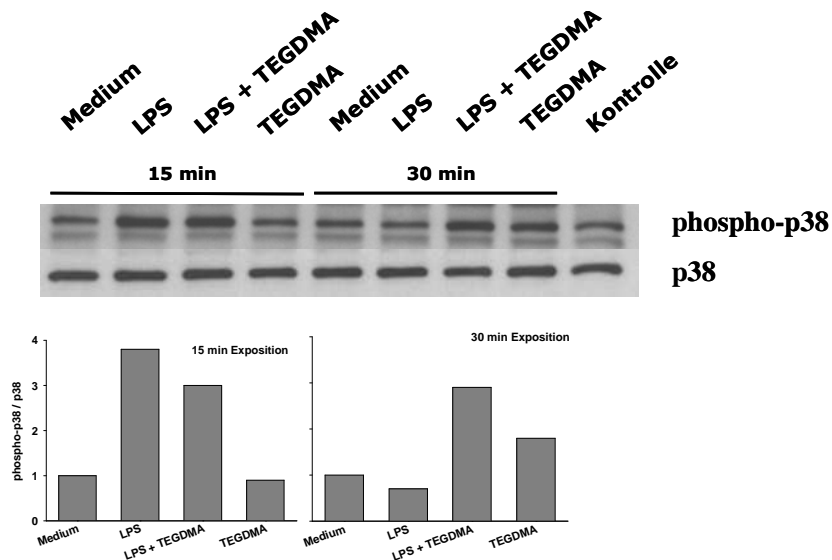


Abb. 7: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, der Kombination 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 15 und 30 min exponiert. Proteine (20 μg) der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-p38 und Gesamt-p38 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (enhanced chemiluminescence) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an p38 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von p38. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS exponiert waren.

4.2.1.2 Die Aktivierung von p38 nach mittleren Expositionszeiten

Nach einer mittleren Expositionsdauer von 1 Stunde war in den RAW264.7 Makrophagen eine Aktivierung von p38 durch LPS verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Medium) nicht mehr erkennbar (Faktor 0,8) (Abb. 8). Auch in den mit LPS plus TEGDMA (Faktor 0,7) sowie mit TEGDMA alleine (Faktor 0,8) behandelten Zellkulturen wurde p38 nicht aktiviert (Abb. 8).

Wurden Zellkulturen LPS für 2 Stunden exponiert, so war ein schwacher Anstieg der Menge an phospho-p38 erkennbar (Faktor 1,2). Auch in den Kulturen, die der Kombination aus LPS und TEGDMA sowie TEGDMA alleine exponiert wurden, war die Menge an phospho-p38 gering erhöht (jeweils Faktor 1,2). Auch in den unbehandelten Kontrollen war phospho-p38 deutlich exprimiert (Abb. 8). Die gesamte Menge an p38 wurde gleichmäßig stark exprimiert (Abb. 8).

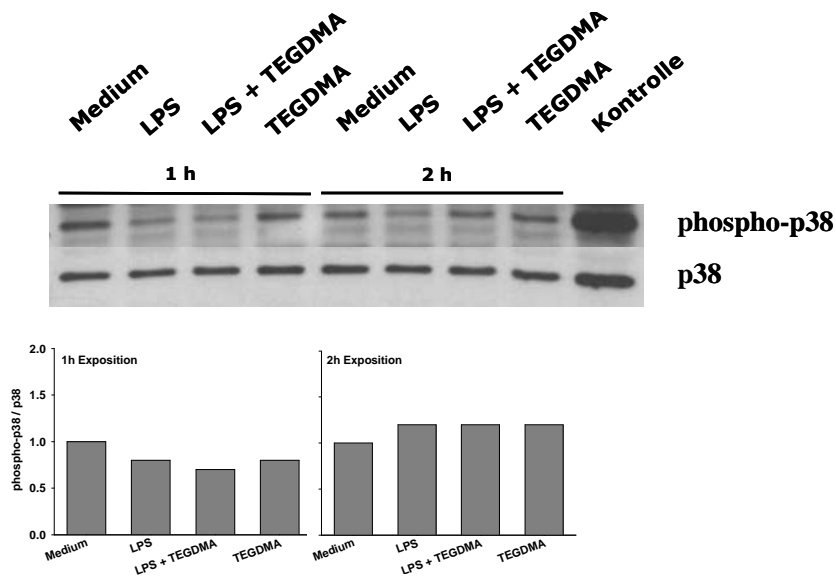


Abb. 8: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, der Kombination 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 1 und 2 Stunden (h) exponiert. Proteine (20 μg) der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-p38 und Gesamt-p38 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an p38 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von p38. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS exponiert waren.

4.2.1.3 Die Aktivierung von p38 nach langen Expositionszeiten

Nach langen Expositionszeiten wurde p38 in RAW264.7 Makrophagen wieder stärker aktiviert. In Kulturen, die LPS für 6 Stunden exponiert waren, stieg die Menge an phospho-p38 um den Faktor 1,2 verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Medium) (Abb. 9). Die Aktivierung mit LPS plus TEGDMA hingegen nahm um das 1,8-fache zu und TEGDMA alleine aktivierte p38 um den Faktor 1,9. Nach einer Expositionszeit von 24 Stunden wurde p38 durch LPS sogar um den Faktor 4,5 aktiviert. Eine noch stärkere Aktivierung von p38 wurde jedoch in den mit TEGDMA behandelten Proben beobachtet. In Verbindung mit LPS stieg die Menge an phospho-p38 um den Faktor 15,6, mit TEGDMA alleine um den Faktor 15,1 (Abb.9). Phospho-p38 war in unbehandelten Kontrollen nur sehr schwach nachzuweisen. Bemerkenswert war auch, dass die gesamte Menge an p38 nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden in

den mit LPS und TEGDMA behandelten Kulturen weniger stark exprimiert wurde als in unbehandelten Kontrollen (Abb. 9).

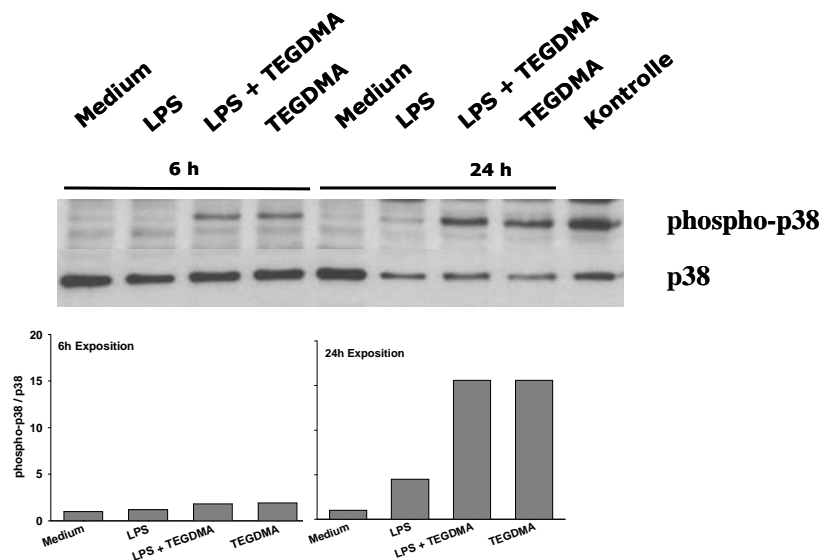


Abb. 9: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1 µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 6 und 24 Stunden (h) exponiert. Proteine (20 µg) der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-p38 und Gesamt-p38 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an p38 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von p38. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren

4.2.2 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2

4.2.2.1 Die Aktivierung von ERK1/2 nach kurzen Expositionszeiten

ERK1/2 wurde in den RAW264.7 Makrophagen durch LPS im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen nach einer Exposition von 15 Minuten um den Faktor 6,5 aktiviert (Abb. 10). LPS in Verbindung mit TEGDMA führte ebenfalls zu einer Erhöhung des Signals für phospho-ERK1/2 (Faktor 4,7), jedoch weniger stark als mit LPS. Mit TEGDMA alleine wurde nach 15 Minuten keine Aktivierung von ERK1/2 gefunden (Faktor 0,8). Nach 30 Minuten Exposition blieb die Aktivierung von ERK1/2

durch LPS verglichen mit der Expositionsdauer von 15 Minuten nahezu gleich hoch (Faktor 6,1), und das Signal für phospho-ERK1/2 in den mit LPS und TEGDMA behandelten Kulturen war sogar um den Faktor 8,4 erhöht. In der nur mit TEGDMA behandelten Probe wurde jedoch wiederum keine Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen (Faktor 0,7). Phospho-ERK1/2 wurde auch in unbehandelten Kontrollen exprimiert. Die gesamte Menge an ERK1/2 war in sämtlichen Kulturen gleich stark exprimiert (Abb. 10).

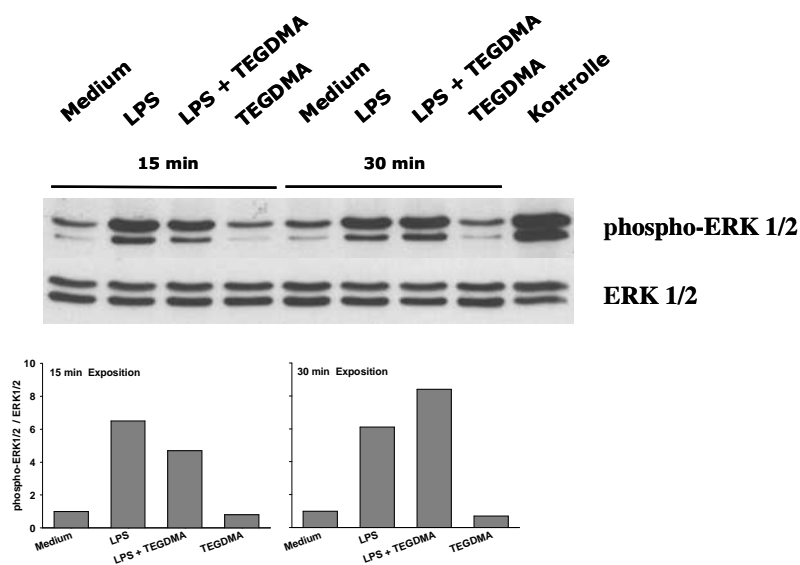


Abb. 10: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1 µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 15 und 30 Minuten exponiert. Proteine (20 µg) der Zell-extrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-ERK1/2 und Gesamt-ERK1/2 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an ERK1/2 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von ERK1/2. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren.

4.2.2.2 Die Aktivierung von ERK1/2 nach mittleren Expositionszeiten

Die Aktivierung von ERK1/2 in den RAW264.7 Makrophagen war nach 1 Stunde Exposition gegen LPS (Faktor 3) immer noch vorhanden, aber deutlich geringer als nach kurzer Exposition (Abb. 11). Es wurde dieselbe Menge an phospho-ERK1/2 in Zellkulturen beobachtet, die mit LPS und TEGDMA (Faktor 3) behandelt wurden.

TEGDMA alleine hingegen inhibierte nun die Menge an phospho-ERK1/2 deutlich (Faktor 0,4) verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Abb. 11). Die Aktivierung von ERK1/2 durch LPS nahm nach 2 Stunden Expositionsdauer weiter ab (Faktor 1,8), und die Kombination von LPS und TEGDMA aktivierte ERK1/2 nicht mehr (Faktor 0,8). TEGDMA alleine inhibierte wiederum die Phosphorylierung von ERK1/2 (Faktor 0,4) (Abb. 11). Phospho-ERK1/2 war in unbehandelten Kontrollen nachweisbar, und Gesamt-ERK1/2 wurde unter allen Bedingungen gleichmäßig exprimiert (Abb. 11)

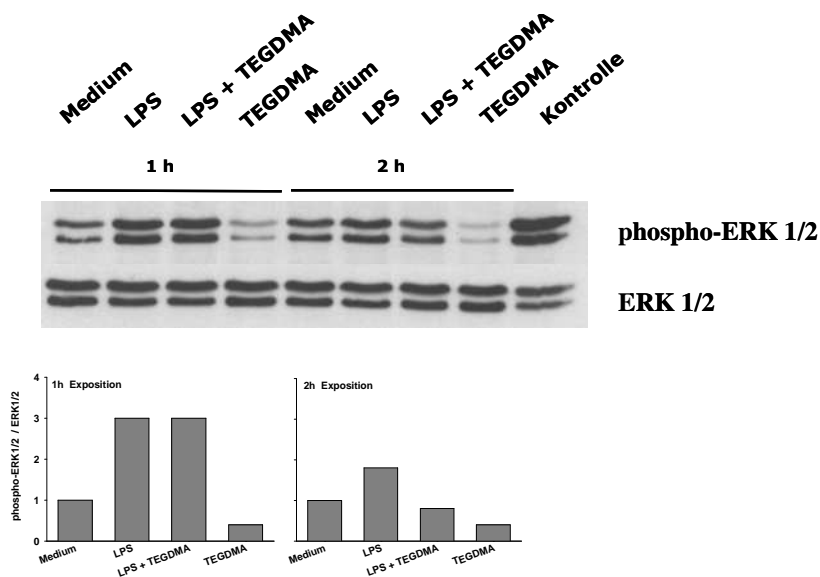


Abb. 11: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 1 und 2 Stunden (h) exponiert. Proteine (20 µg) der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-ERK1/2 und Gesamt-ERK1/2 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an ERK1/2 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von ERK1/2. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren.

4.2.2.3 Die Aktivierung von ERK1/2 nach langen Expositionszeiten

Nach 6 Stunden Expositionszeit war wiederum nur eine geringe Aktivierung von ERK1/2 durch LPS (Faktor 2,2) sowie durch die Kombination aus LPS und TEGDMA (Faktor 1,4) erkennbar. TEGDMA hingegen führte zu keiner verstärkten Expression

von phospho-ERK1/2 (Faktor 0,9) verglichen mit unbehandelten Zellkulturen (Abb.12). Gesamt-ERK1/2 wurde nach 6 Stunden Exposition in allen Zellkulturen gleichmäßig exprimiert.

Nach 24 Stunden stieg die Menge an phospho-ERK1/2 in LPS-exponierten Zellkulturen jedoch deutlich (Faktor 7). In den mit LPS plus TEGDMA behandelten Zellen wurde ERK1/2 noch stärker aktiviert (Faktor 18,8), ähnlich wie durch TEGDMA alleine (Faktor 19,1) (Abb.12). Die gesamte Menge an ERK1/2 wurde nach der langen Expositionsdauer von 24 Stunden in den mit LPS und TEGDMA behandelten Kulturen schwächer exprimiert als in unbehandelten Kontrollen (Abb. 12).

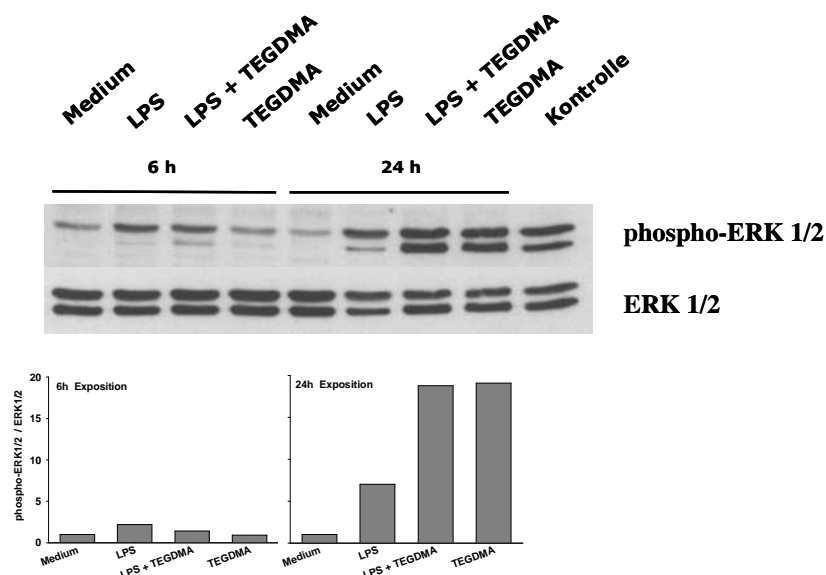


Abb. 12: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1 µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 6 und 24 Stunden (h) exponiert. Proteine (20 µg) der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-ERK1/2 und Gesamt-ERK1/2 wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte der phosphorylierten Form zur gesamten Menge an ERK1/2 und sind damit ein Maß für die Aktivierung von ERK1/2. Als Kontrolle wurden Extrakte aus Zellen verwendet, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren.

4.2.3 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK

4.2.3.1 Die Aktivierung von JNK nach kurzen Expositionszeiten

LPS bewirkte nach einer Expositionszeit von 15 Minuten einen Anstieg der aktivierten Form von JNK in RAW264.7 Makrophagen verglichen mit unbehandelten Kulturen (Faktor 6,8) (Abb. 13). LPS in Kombination mit TEGDMA erhöhte ebenfalls die Menge an phospho-JNK (Faktor 4,0), jedoch weit weniger stark als LPS allein, und eine Aktivierung von JNK durch TEGDMA alleine war nach 15 Minuten Exposition nicht nachzuweisen (Faktor 1,0). Auffallend war, dass phospho-JNK in unbehandelten Kontrollen fast gar nicht detektiert wurde.

Nach 30 Minuten Exposition war die Aktivierung von JNK durch LPS bereits stark reduziert (Faktor 2,4), das Signal in den mit LPS und TEGDMA behandelten Zellen blieb jedoch in etwa so hoch wie nach 15 Minuten (Faktor 3,7). In der mit TEGDMA alleine behandelten Zellkultur wurde keine Aktivierung von JNK (Faktor 1,1) nachgewiesen (Abb. 13). Die Menge an GAPDH, der Bezugspunkt für die Abschätzung der Aktivierung von JNK, wurde in allen Kulturen gleichmäßig stark exprimiert (Abb. 13).

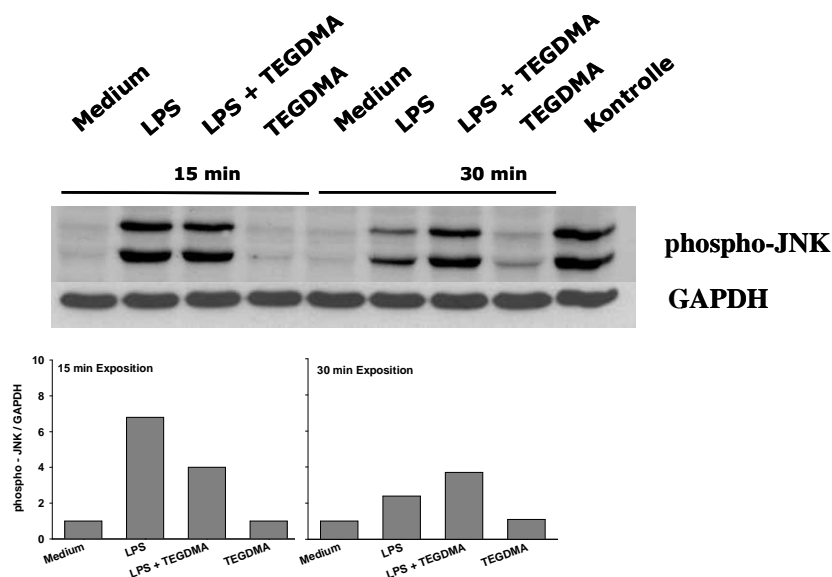


Abb. 13: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1 µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 15 und 30 Minuten exponiert. Proteine (20 µg) der Zelle extrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-JNK und GAPDH wurden mit spezifischen

Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte für phospho-JNK und GAPDH und sind damit ein Maß für die Aktivierung von JNK. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren.

4.2.3.2 Die Aktivierung von JNK nach mittleren Expositionszeiten

Nach einer Expositionsdauer von 1 Stunde wurde in den LPS-exponierten Zellkulturen keine Aktivierung von JNK (Faktor 0,8) mehr gefunden (Abb. 14). Auch LPS in Kombination mit TEGDMA und TEGDMA alleine aktivierten JNK nicht (jeweils Faktor 0,8). Auch nach 2 Stunden Exposition war in den mit LPS (Faktor 1,1), LPS und TEGDMA (Faktor 0,8) sowie mit TEGDMA alleine behandelten Kulturen (Faktor 1,0) eine Aktivierung von JNK nicht nachzuweisen (Abb. 14). Bemerkenswert war hier wiederum, daß phospho-JNK in sämtlichen Kulturen einschließlich der unbehandelten Kontrollen nur sehr schwach detektiert wurde. GAPDH wurde jedoch in allen Kulturen sehr deutlich exprimiert (Abb. 13).

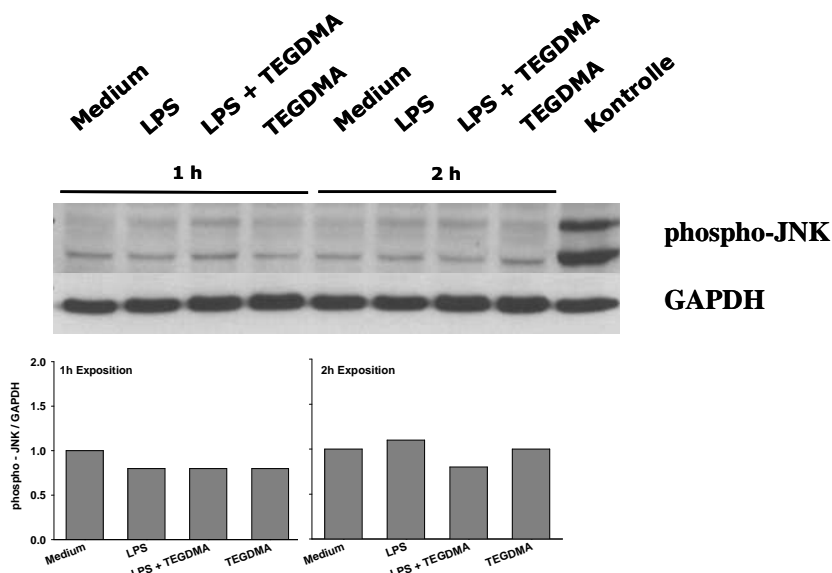


Abb. 14: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 1 und 2 Stunden (h) exponiert. Proteine (20 µg) der Zelleextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-JNK und GAPDH wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-

exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte für phospho-JNK und GAPDH und sind damit ein Maß für die Aktivierung von JNK. Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren.

4.2.3.3 Die Aktivierung von JNK nach langen Expositionszeiten

JNK wurde nach 6 Stunden Exposition in den RAW264.7 Makrophagen weder durch LPS noch durch LPS plus TEGDMA (jeweils Faktor 0,9) und auch nicht durch TEGDMA alleine (Faktor 0,8) aktiviert (Abb. 15). Nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden war eine geringe Aktivierung von JNK durch LPS (Faktor 1,6) nachzuweisen, und LPS mit TEGDMA (Faktor 1,4) und TEGDMA alleine (Faktor 1,3) aktivierten JNK ebenfalls in geringem Maße (Abb. 15). Auch nach den langen Expositionszeiten war die nur sehr schwache Expression von phospho-JNK bemerkenswert, GAPDH wiederum war in allen Kulturen deutlich nachweisbar (Abb. 13).

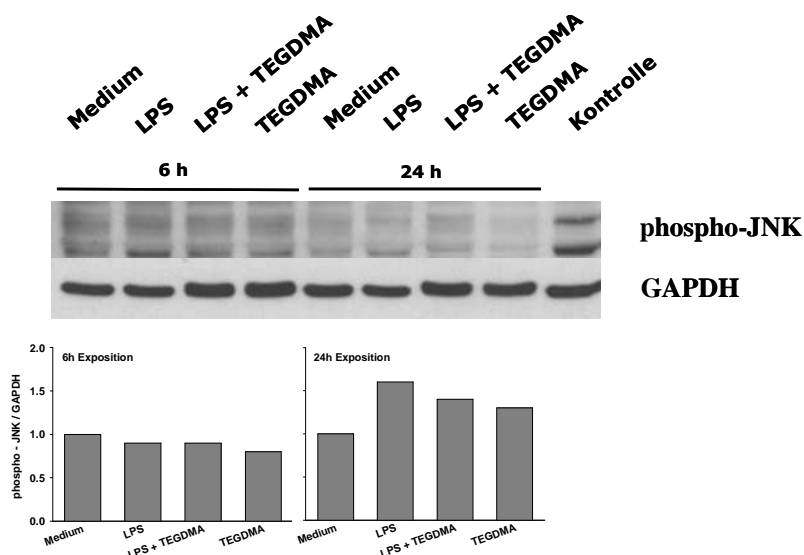


Abb. 15: Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 0,1 µg/ml LPS, der Kombination 0,1 µg/ml LPS/3 mM TEGDMA sowie 3 mM TEGDMA alleine für 6 und 24 Stunden (h) exponiert. Proteine (20 µg) der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt, und phospho-JNK und GAPDH wurden mit spezifischen Antikörpern und ECL (*enhanced chemiluminescence*) in Extrakten LPS- oder TEGDMA-exponierter Zellen und unbehandelter Kontrollen (Medium) im Western Blot detektiert. Die Grafen unter den Bahnen zeigen das jeweilige Verhältnis der densitometrisch ermittelten Grauwerte für phospho-JNK und GAPDH und sind damit ein Maß für die Aktivierung von JNK.

Kontrolle: Extrakte aus Zellen, die in Vorversuchen für 15 min 0,1 µg/ml LPS exponiert waren

5 Diskussion

5.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Eukaryontische Zellen erkennen über Rezeptoren an der Zelloberfläche oder über intrazelluläre Rezeptoren interne und externe Signale (*stressors*) und wandeln diese über Signaltransduktionswege in zelluläre Reaktionen um (Takeda *et al.*, 2008). Mitogen-aktivierte Proteinkinasen bilden untereinander verknüpft eine dieser Signalketten (Hayakawa *et al.*, 2006). Unter physiologischen Bedingungen wird ein Mitogen von Rezeptoren in der Zellmembran, beispielsweise *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) erkannt, und dieses Signal wird über eine Kette von Proteinaktivierungen bis hin zu den MAPK JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), p38 MAPK und ERK1/2 (*extracellular signalregulated kinase*) weitergeleitet (Arrighi *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2003). Die Funktion des Signalwegs über ERK1/2 dient wohl bevorzugt der Regulation der Zellproliferation. JNK und p38 hingegen werden vor allem durch eine Reihe sehr unterschiedlicher Stressoren aus der Umwelt aktiviert, etwa durch osmotischen Schock, UV-Strahlung, Hitzeschock, oxidativen Stress (ROS), aber auch durch die Stimulierung physiologischer Faktoren wie Fas und proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha (*tumor necrosis factor*), IL-1 (Interleukin-1) oder IL-6 (Tibbles und Woodgett, 1999; Matsuzawa und Ichijo, 2005).

Ein Signal für die Aktivierung von MAPK sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die in einer bestimmten Konzentration für das physiologische Gleichgewicht und so für die Steuerung der Zellproliferation, etwa über die Aktivierung der MAPK ERK1/2, notwendig sind (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Andererseits stören Umweltfaktoren die ROS-Homöostase und können über die Erzeugung von oxidativem Stress zum Zelltod via Apoptose führen. Man nimmt an, dass ERK1/2 hauptsächlich als anti-apoptotischer Regulator fungiert, während die Stresskinasen JNK und p38 als pro-apoptotische MAPK diskutiert werden (Guyton *et al.*, 1996; Matsuzawa und Ichijo, 2005). Auch wenn der genaue Mechanismus der kausalen Interaktion nicht bekannt ist, wurde wiederholt die Verbindung zwischen einer erhöhten Produktion an ROS,

der Aktivierung von Stresskinasen und der Induktion von Apoptose beschrieben. Umgekehrt inhibieren Antioxidantien und thiolreduzierende Substanzen wie *N*-Acetylcystein (NAC) und Dithiothreitol (DTT) oder antioxidative Enzyme wie die Mangansuperoxiddismutase (SOD2) oder die Glutathione-S-transferase die durch Stresskinasen induzierte Apoptose (Maehara *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Saeki *et al.*, 2002; Townsend und Tew, 2003; Deshpande und Kehrer, 2006). Für Monomere zahnärztlicher Komposite wie TEGDMA und HEMA ist beschrieben, dass sie die Mengen an ROS in Zellkulturen erhöhen, Apoptose induzieren und zelluläre Signalwege über PI-3K und MAPK aktivieren können (Samuelsen *et al.*, 2007; Spagnuolo *et al.*, 2008; Eckhardt *et al.*, 2009).

5.1.1 Aktivierung von MAPK durch das zahnärztliche Monomer TEGDMA

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, welche der MAPK in RAW264.7 Makrophagen möglicherweise durch TEGDMA spezifisch aktiviert oder inhibiert wird. Außerdem sollte der zeitliche Verlauf einer differenziellen Aktivierung der verschiedenen MAPK, der bisher ebenfalls nicht bekannt war, untersucht werden. Das Wissen darüber sollte Hinweise darauf geben, welche der verschiedenen MAPK mit den unterschiedlichen zellulären Funktionen wie der Zytokinproduktion in Makrophagen, der Regulation des Zellzyklus oder der Induktion von Apoptose mechanistisch verbunden sein kann.

Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen sind Zielzellen zahnärztlicher restaurativer Werkstoffe. Daher wurden sämtliche Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit murinen RAW264.7 Makrophagen als Modell für das zelluläre Immunsystem durchgeführt. Diese Zellen sind in vielerlei Hinsicht charakterisiert und eignen sich neben ihren spezifischen Leistungen wie der Produktion von Zytokinen oder der Expression von Oberflächenmarkern allgemein sehr gut für das Studium der genannten Fragestellungen (Eckhardt *et al.*, 2009). So zeigten Analysen, dass das Monomer TEGDMA in den RAW-Makrophagen auch die Produktion reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS) förderte und Apoptose induzierte (Schweikl, 2009; Krifka *et al.*, 2009).

Das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) diente in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für die Aktivierung von MAPK in RAW-Makrophagen. LPS bindet vermittelt über das LBP (*LPS binding protein*), das Oberflächenantigen CD14 (*cluster of differentiation 14*) und MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) an den Rezeptor TLR4 in der Zellmembran. Der aktivierte TLR4 aktiviert seinerseits MyD88-abhängige (*myeloid differentiation factor 88*) und MyD88-unabhängige Signalwege bis hin zu der ausführlich diskutierten Aktivierung MAPK downstream (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Wie erwartet aktivierte LPS auch unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen bereits nach kurzen Expositionszeiten die MAPK p38, ERK1/2 und JNK in den RAW264.7 Makrophagen (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Zwei verschiedene LPS-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Aktivierung von p38, ERK1/2 und JNK. Somit konnten mit LPS als aktivierender Substanz und mit Extrakten LPS-stimulierter RAW-Makrophagen als Kontrolle Veränderung in der Aktivierung von MAP-Kinasen durch dentale Monomere wie TEGDMA aber auch durch LPS zu verschiedenen Zeiten nachgewiesen werden.

5.2 Aktivierung von MAPK durch LPS und das dentale Monomer TEGDMA

In der vorliegenden Arbeit aktivierte LPS schon nach 15 Minuten Exposition die MAPK p38, ERK1/2 sowie JNK. Diese Aktivierung ist jedoch bei p38 und JNK bereits nach 30 Minuten Exposition rückläufig. Die MAPK ERK1/2 bleibt auch nach 30 Minuten Exposition stark aktiviert. In Zellkulturen die für 2 Stunden LPS exponiert wurden, zeigte sich ein schwacher Anstieg der Menge an phospho-p38, die Aktivierung von JNK war bereits nach 1 Stunde beendet und bei ERK1/2 fiel sie nach 1 Stunde geringer aus als nach kurzer Exposition und nahm nach 2 Stunden und 6 Stunden Expositionsdauer weiter ab. Nach 24 Stunden stieg die Menge an phospho-ERK1/2 in LPS-exponierten Zellkulturen deutlich, bei JNK geringfügig an. Nach langen

Expositionszeiten (6 Stunden) wurde auch p38 in RAW264.7 Makrophagen wieder stärker aktiviert.

Die kurze Exposition von Zellkulturen mit LPS und eine darauf folgende starke Aktivierung aller MAPK steht vermutlich im Zusammenhang mit der Zytokinproduktion (Ulevitch RJ., 2000). Die schnelle Aktivierung der MAP-Kinase p38 ist als ein Signal für die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine beschrieben (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Andererseits wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 in Zellkulturen, die für 24 Stunden mit LPS behandelt wurden, in Zusammenhang mit Apoptose gebracht (Xaus *et al.*, 2000; Xaus *et al.*, 2001; Zanoni *et al.*, 2009). Weil nach kurzen Expositionszeiten die Aktivierung von MAPK mit der Freisetzung von Zytokinen verbunden zu sein scheint, nach langen Expositionszeiten jedoch mit Apoptose, darf man annehmen, dass der Aktivierung der MAPK durch LPS offensichtlich abhängig von der Dauer der Exposition unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen.

5.2.1 Aktivierung von p38 durch TEGDMA

In der vorliegenden Arbeit wurde die MAPK p38 erst nach 30 Minuten Expositionszeit auch durch TEGDMA aktiviert. Im Gegensatz zur schnellen Aktivierung von p38 durch LPS bereits nach 15 Minuten erfolgte jedoch hierbei keine Aktivierung der Sekretion von Zytokinen. Vielmehr inhibierte TEGDMA alleine und in Kombination mit LPS die Sekretion von Zytokinen nach 30 Minuten (Dr. Schweikl, *pers. Mitteilung*; Eckhardt *et al.*, 2009). Bemerkenswert bleibt dennoch, dass p38 die einzige der MAPK war, die nach der Expositionszeit von 30 Minuten durch TEGDMA alleine aktiviert wurde. Nach langen Expositionszeiten stieg die Aktivierung von p38 durch LPS, LPS/TEGDMA und TEGDMA zeitabhängig. Auffällig ist dabei die wesentlich stärkere Aktivierung von p38 durch TEGDMA als durch LPS. LPS und TEGDMA starten möglicherweise nach langen Expositionszeiten über die Aktivierung von p38 andere Zellprogramme als nach den kurzen Expositionszeiten von 15 und 30 Minuten. Möglicherweise ist die

späte und lang anhaltende Aktivierung von p38 mit der Induktion von Apoptose durch LPS und TEGDMA assoziiert (Schweikl, 2009; Krifka *et al.*, 2009).

5.2.2 Aktivierung von ERK1/2 durch TEGDMA

Vergleicht man die Aktivierung von p38 und ERK1/2 in RAW-Makrophagen nach kurzen und mittleren Expositionszeiten, so sind deutliche Unterschiede erkennbar. Während die Aktivierung von p38 durch LPS nach 30 Minuten bereits beendet war, wurde ERK1/2 durchaus noch aktiviert. Bis zu einer Expositionszeit von 2 Stunden zeigte sich bei ERK1/2 eine zeitabhängige Abnahme der Wirkung von LPS. Wahrscheinlich ist deshalb auch der Mechanismus der späten Aktivierung von ERK1/2 durch LPS nach 6 und 24 Stunden Exposition anders als für die Aktivierung zwischen 15 Minuten und 2 Stunden. Die stetige Abnahme der Aktivierung von ERK1/2 durch LPS beginnend mit der Exposition bis hin zu 2 Stunden könnte als Mechanismus gesehen werden, über den ERK1/2 der Wirkung von LPS auf p38 entgegenwirkt. Dies könnte dazu beitragen, dass nicht dauerhaft Zytokine produziert werden und das Phänomen des septischen Schocks ausgelöst wird (Eckhardt *et al.*, 2009). Andererseits ist momentan nicht auszuschließen, dass über einen alternativen Weg das aktivierte p38 seine eigene Inhibition startet (Schweikl, 2009). Mit TEGDMA alleine war nach 1 und 2 Stunden Exposition keine Aktivierung, sondern sogar eine Inhibition der Bildung von phospho-ERK1/2 nachzuweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ERK1/2 möglicherweise auch eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus der RAW-Zellen übernimmt. ERK1/2 ist ein starker positiver Regulator des Zellzyklus und wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert (Chambard *et al.*, 2007). Die Aktivierung von ERK1/2 ist vor allem für den Übergang aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus bedeutsam. ERK1/2 steuert die Synthese des Cyclin D1 auf der Transkriptionsebene in Koordination mit der aktivierten PI3-Kinase (Katz *et al.*, 2007). ERK1/2 reguliert ferner den Zellzyklus über die Bildung von Cyclin/CDK-Komplexen (Cyclin D1/CDK4). Außerdem ist ERK1/2 wahrscheinlich an der Regulation des Übergangs von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus beteiligt (Sefton, 2001;

Garnovskaya *et al.*, 2004; Chambard *et al.*, 2007). Im Unterschied zu ERK1/2 ist p38 ein negativer Regulator der Synthese von Cyclin D1 (Lavoie *et al.*, 1996). Dies bedeutet, dass ein hoher Anteil an phosphoryliertem p38, das Fortschreiten des Zellzyklus unterbindet, ein Vorgang, der durch die Zugabe des p38-Inhibitors SB203580 aufgehoben werden kann (Lavoie *et al.*, 1996). Für das Monomer TEGDMA ist eine inhibierende Wirkung auf den Zellzyklus in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Schweikl *et al.*, 2005).

Die starke Aktivierung von ERK1/2 durch LPS und noch viel mehr durch TEGDMA nach 24 Stunden lässt jedoch auf einen weiteren Mechanismus schließen. Die Aktivierung erfolgt dann vermutlich über Signalwege, die dem durch LPS und TEGDMA induzierten und wahrscheinlich durch p38 und JNK vermittelten programmierten Zelltod (Apoptose) entgegenwirken. LPS als auch TEGDMA aktivieren wohl ERK1/2 als Schutzfaktor um das Überleben der Zellen zu fördern, und p38 entgegenzuwirken (Schweikl, 2009). Auffallend ist, dass nach der langen Expositionszeit von 24 Stunden die Expression des gesamten ERK1/2 in den mit LPS, LPS/TEGDMA und TEGDMA behandelten Kulturen, ähnlich wie mit p38 beobachtet, wieder schwächer ist als in unbehandelten Kontrollen. Aufgrund der gleichmäßigen Färbung der Proteine in allen Bahnen oder Fraktionen auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau war bekannt, dass für alle Bedingungen die gleiche Proteinmenge geblottet wurde. Daher darf man vermuten, dass TEGDMA spezifisch die Expression der MAPK auf der Transkriptions- oder Translationsebene inhibierte.

5.2.3 Aktivierung von JNK durch TEGDMA

Die Form der Aktivierung von JNK durch LPS und TEGDMA unterschied sich deutlich von der Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2. Während die frühe Aktivierung von JNK durch LPS und TEGDMA der Aktivierung von ERK1/2 sehr ähnlich war, war sie von derjenigen von p38 verschieden. Nach Expositionszeiten von 1 und 2 Stunden hingegen gleicht die JNK-Aktivierung derjenigen von p38. Man darf vermuten, dass die Funktionen der beiden Stresskinasen p38 und JNK in TEGDMA-exponierten

Zellkulturen verschieden sind [Schweikl, 2009]. Nach langen Expositionszeiten von 6 und 24 Stunden war die Aktivierung von JNK wiederum sehr gering und damit deutlich unterschiedlich zu derjenigen von p38 und Erk1/2. Weil nach langen Expositionszeiten auch der Anteil an Zellen in Apoptose zunahm [Krifka *et al.*, 2010], ist anzunehmen, dass JNK in den RAW264.7 Makrophagen in Anwesenheit von TEGDMA eher nicht für die Aktivierung von Signalwegen, die zu Apoptose führen, verantwortlich ist [Schweikl, 2009]. Diese Beobachtung läßt außerdem auf eine zell-spezifische Erscheinung schließen, denn JNK wurde in anderen Zelltypen mit Apoptose in Zusammenhang gebracht [Samuelsen *et al.*, 2007]. Die MAPK p38 und ERK1/2 wiederum könnten wegen der zwar unterschiedlichen, aber in den RAW264.7 Makrophagen immer nachweisbaren Aktivierung eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus, aber auch bei anderen Phänomenen wie der Inhibition der Expression von Zytokinen und der Induktion von Apoptose spielen [Eckhardt *et al.*, 2009; Schweikl, 2009]. Der Zeitpunkt und die Dauer der Einwirkung scheinen ausschlaggebend zu sein, welcher der Wege in Anwesenheit einer Substanz wie TEGDMA oder LPS genommen wird.

5.3 Auswirkung der Aktivierung von MAPK durch LPS / TEGDMA in Pulpazellen

Die Veränderung der Phosphorylierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK durch TEGDMA wurde vergleichend mit den RAW264.7 Makrophagen auch in humanen Pulpazellen (tHPC) analysiert. Dabei war die Aktivierung der MAPK in den Pulpazellen deutlich anders als in den RAW264.7-Makrophagen. So konnte keine Aktivierung der Stresskinasen p38 und JNK durch TEGDMA in tHPC-Kulturen nach kurzen oder mittleren Expositionszeiten nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu wurde ERK1/2 durch TEGDMA über die gesamte Beobachtungszeit und mit zunehmender Dauer stärker aktiviert [Krifka *et al.*, 2010]. Die starke Aktivierung von ERK1/2 nach 24 Stunden Exposition durch TEGDMA war, zumindest teilweise, eine Folge der geringeren Expression von Gesamt-ERK1/2. In ähnlichem Maße wie p38

wurde auch JNK nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden durch TEGDMA allein aktiviert (Krifka *et al.*, 2010). In RAW-Makrophagen wurden ERK1/2 und die Stresskinasen p38 und JNK abhängig von der Expositionszeit unterschiedlich aktiviert. Als Grund für die unterschiedliche Aktivierung von MAPK in RAW-Makrophagen nach kurzen Expositionszeiten wird ein Zusammenhang mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies angenommen (Samuelsen *et al.*, 2007; Spagnuolo *et al.*, 2008; Engelmann *et al.*, 2005). Die Bildung von ROS könnte auch für die noch geringe Aktivierung von ERK1/2 in Pulpazellen nach kurzen Expositionszeiten verantwortlich sein. Momentan bleibt der Grund für die Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung der einzelnen MAPK in RAW264.7-Makrophagen und Pulpazellen nach kurzen Expositionszeiten noch unklar. Allerdings sollten Analysen, etwa welche reaktiven Sauerstoffspezies generiert wurden, Einzelheiten der unterschiedlichen Aktivierung der verschiedenen MAPK in den beiden unterschiedlichen Zelllinien erkennen lassen (Krifka 2009).

5.4 Die Induktion von Apoptose in RAW264.7 Makrophagen

Die Rolle der MAPK ERK1/2, JNK und p38 für die Induktion von Apoptose wurde bereits an anderer Stelle ausführlich diskutiert (vgl. Kapitel 1.2.5). Wesentlich scheint zu sein, dass nach gegenwärtigem Stand des Wissens vor allem die Bildung von ROS über das zu kontrollierende Maß hinaus zur Aktivierung von MAPK führt (Matsuzawa *et al.*, 2002; Tobiume *et al.*, 2001). So ist die Entstehung von oxidativer Stress und die Störung der zellulären Redoxhomöostase ein Grund für die Induktion von Apoptose. Es ist bekannt, dass die zeit- und konzentrationsabhängige Produktion von ROS in Anwesenheit von Monomeren mit der Induktion von Apoptose in verschiedenen Zelllinien assoziiert ist. So verursachten etwa TEGDMA und HEMA Apoptose in primären humanen Pulpazellen und primären humanen Fibroblasten (Spagnuolo *et al.*, 2004a; Spagnuolo *et al.*, 2004b; Spagnuolo *et al.*, 2006). TEGDMA und LPS sowie die Kombination aus LPS/TEGDMA induzierten außerdem Apoptose in transformierten humanen Pulpazellen und RAW264.7 Makrophagen (Schweikl, 2009;

Krifka *et al.*, 2010). Diese Analysen zur Induktion von Apoptose durch TEGDMA mit RAW264.7 Makrophagen wurden parallel zu den hier präsentierten Ergebnissen zur Phosphorylierung der MAPK durchgeführt und sollen daher ausführlicher anhand der Daten nach einer Exposition von 24 Stunden interpretiert werden.

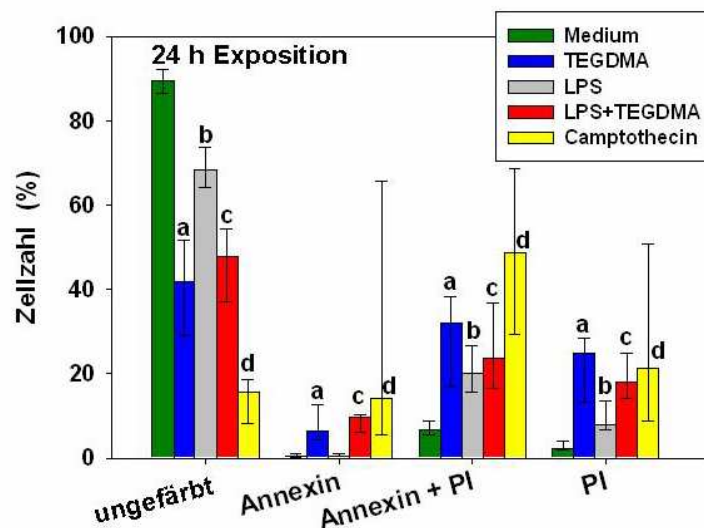


Abb.16: Induktion von Apoptose in RAW-Makrophagen.

Die Balken repräsentieren Mediane (plus 25 und 75% Perzentile; n=4-5) für die Zahl der Zellen nach Exposition gegen TEGDMA (3 mM), LPS (0,1 µg/ml), eine Kombination aus LPS und 3 mM TEGDMA sowie 0,5 µg/ml Camptothecin.

Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 24 h dauerhaft exponiert.

Ungefärbt = Zahl der vitalen Zellen; Annexin = Zahl der Zellen in Apoptose; Annexin + PI = Anteil der Zellen in später Apoptose; PI = Anteil der Zellen in Nekrose; a-d markieren statistisch signifikante Unterschiede der jeweiligen Mediane zu den Medianen unbehandelter Kontrollen (Medium) (vgl. Schweikl, 2009; Krifka *et al.*, 2010).

Wie erwartet, wirkte LPS, die positive Kontrolle für die zeitabhängige Aktivierung von MAPK in den Makrophagen, nach 24 Stunden Exposition zytotoxisch (Abb. 16). Die Zahl überlebender Zellen blieb nach Exposition gegen LPS über den gesamten Beobachtungszeitraum (15 Minuten bis 24 Stunden) annähernd konstant, und die Prozentzahl an Annexin V-markierten Zellen war niedrig. Diese Ergebnisse ähneln denen anderer Autoren mit derselben Zelllinie (Xaus *et al.*, 2000; Seminara AR, Ruvolo PP, Murad F., 2007). Camptothecin war vergleichbar effektiv wie TEGDMA in RAW-Makrophagen nach langen Expositionszeiten. Die hier präsentierten Ergebnisse mit dem Monomer TEGDMA stimmen mit Untersuchungen an Pulpazellen und

Gingivafibroblasten nach anhaltender Exposition überein (Geurtsen *et al.*, 2003; Spagnuolo, Schweikl *et al.*, 2004). Darüber hinaus besteht eine enge Korrelation zwischen der Aktivierung der MAPK in Anwesenheit von TEGDMA und dem konzentrationsabhängigen Verlust vitaler Zellen nach langen Expositionszeiten sowohl in RAW-Makrophagen als auch in Pulpazellen (Krifka *et al.*, 2010). Auffällig war, dass die Zunahme des Anteils der Zellen in Apoptose und Nekrose nach 24 Stunden verglichen mit 6 Stunden der Zunahme des Grads der Aktivierung der verschiedenen MAPK zu diesen Zeitpunkten entsprach (Schweikl, 2009; Krifka *et al.*, 2010). Daher darf man vermuten, dass die MAPK p38 und ERK1/2 auch an der Regulation der TEGDMA-induzierten Apoptose beteiligt sind. Diese Beobachtungen könnten zur Formulierung einer Arbeitshypothese führen, nach der Monomere wie TEGDMA Apoptose über die Aktivierung der MAPK und Transkriptionsfaktoren *downstream* induzieren könnten.

Die hier diskutierten Ergebnisse decken sich teilweise mit denen zur Untersuchung der Aktivierung von MAPK in einer Speicheldrüsenzelllinie (Samuelsen *et al.*, 2007). Dabei wurde beobachtet, dass die Zahl der apoptotischen Speicheldrüsenzellen nach Inhibition der Phosphorylierung von ERK durch den spezifischen Inhibitor PD98059 nach Exposition gegen HEMA und TEGDMA anstieg. Auch nach einer Inhibition der Aktivierung von JNK war die Zahl der Zellen in Apoptose reduziert (Samuelsen *et al.*, 2007). Desweiteren wurde eine starke Phosphorylierung sowohl von p38 als auch von JNK nach HEMA-/TEGDMA-Exposition gefunden. Die Behandlung mit dem p38 spezifischen Inhibitor SB202190 führte zu einer enormen Reduktion der Zellen, die HEMA exponiert waren. Daraus wurde geschlossen, dass p38 für die Induktion von Apoptose durch HEMA wichtig ist. Der Einsatz des spezifischen JNK-Inhibitors SB600125 wiederum reduzierte die Menge an Zellen, die nach HEMA- und TEGDMA-Exposition in Apoptose übergingen.

Trotz verschiedenster Erkenntnisse bezüglich der Aktivierung von MAPK und Apoptose fehlt momentan die Erklärung der Kausalität zwischen Wirkung der bisher untersuchten Umweltstressoren und der Induktion von Apoptose. Es wurde von anhaltender Aktivierung der MAPK berichtet, aber die Regulation des Überlebens von

Zellen und der Übergang in Apoptose wurden unterschiedlich diskutiert. Beispielsweise wurde in Anwesenheit von Cadmiumchlorid eine rasche Phosphorylierung von p38 beobachtet, wobei eine Aktivierung von ERK1/2 erst nach langen Expositionszeiten nachgewiesen werden konnte. Es schien als ob der Eintritt von Apoptose mit der Aktivierung von p38 durch oxidativen Stress zusammenhängt. Dagegen steht die anhaltende Aktivierung von ERK1/2 in manchen Zellmodellen als schützender Faktor für das Überleben von Zellen (Galan, Garcia-Bermejo, Kazanietz *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2002).

5.5 Schlussfolgerung

Die bisherigen Arbeiten haben gezeigt, dass Monomere dentaler Werkstoffe wie TEGDMA und HEMA in Zelllinien unterschiedlicher Herkunft genotoxisch und zytotoxisch wirken. Dentale Monomere stören die zelluläre Redoxhomöostase durch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und aktivieren MAPK (Schweikl *et al.*, 2006). Es wurde außerdem berichtet, dass Monomere Proteinkinasen wie die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) oder auch den Transkriptionsfaktor NFκ-B aktivieren können, die das Zellüberleben regulieren. Desweiteren können Monomere zentrale Leistungen von Zellen des Immunsystems inhibieren, beispielsweise die MAPK-abhängige Expression von Oberflächenantigenen oder die Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation der Zellen mit einem Endotoxin (LPS) pathogener Organismen. Monomere erzeugen ferner oxidative DNA-Schäden, sie verzögern den Zellzyklusarrest und sie sind mutagen. Man darf daher vermuten, dass oxidative DNA-Schäden eine Ursache von Zelltod via Apoptose sein könnten. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass die durch Monomere induzierte Apoptose auch durch die späte Aktivierung der MAPK p38, JNK und ERK1/2 vermittelt sein könnte.

Diese Ergebnisse einer Vielzahl überwiegend deskriptiv ausgerichteter Untersuchungen zeigten bisher eine Parallelität, jedoch nicht die ursächliche Verbindung zytotoxischer (und genotoxischer) Effekte und möglicher zugrunde liegender Mechanismen. Die Frage nach der Kausalität zytotoxischer Effekte dentaler Monomere ist bis heute nicht beantwortet und sollte nun untersucht werden. Eine Strategie dazu wäre sicherlich die Verwendung spezifischer pharmakologischer und genetischer Inhibitoren der Aktivierung der auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten MAPK und der damit verbundenen Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits das Programm der Apoptose aktivieren und exekutieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Biologisch nachteilige Effekte kunststoffbasierter dentaler Füllungsmaterialien in eukaryontischen Zellen basieren in erster Linie auf molekularen Mechanismen der zellulären Reaktion. Die vermehrte intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Folge einer Exposition von Zellen gegen dentale Monomere stört die zelluläre Redoxhomöostase. In der Folge werden beispielsweise in Zellen oraler Gewebe Signalwege aktiviert, die das Überleben von Zellen regulieren, wie die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) oder der Transkriptionsfaktor NF κ -B. Auch spezifische Funktionen von Zellen des Immunsystems werden durch Monomere beeinträchtigt. So können beispielsweise die MAPK-abhängige Expression von Oberflächenantigenen oder die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach Stimulation der Zellen mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) aus pathogenen Organismen inhibiert werden.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) dienen, zusammengeschlossen zu Kaskaden als eine Signalkette, der Steuerung der Homöostase in Zellen. Die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 sind besonders gut erforscht. Sie haben Einfluss auf die Regulation von Signalwegen, die dem Überleben von Zellen dienen, oder aber in Zellen Apoptose induzieren. Sie steuern aber auch wichtige Zellfunktionen wie die Zellproliferation und sind für die Regulation der Immun- und Stressantwort von großer Bedeutung. Erhöhte Mengen an ROS beeinflussen diese MAP-Kinasen, wodurch es überwiegend zur Aktivierung der SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinasen) JNK und p38, sowie zur Induktion von Apoptose kommt.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des Kunststoffmonomers TEGDMA auf die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Kinetik dieser Aktivierung oder Inaktivierung. Schließlich sollte auch der zeitabhängige Zusammenhang zwischen der Aktivierung oder Inaktivierung der MAP-Kinasen und dem Übergang von Zellen in Apoptose diskutiert werden.

Die experimentelle Durchführung erfolgte ausschließlich mittels der gut charakterisierten Makrophagenzelllinie RAW264.7. Die Zellen wurden dem Monomer

TEGDMA (3 mM) und LPS und einer Kombination von TEGDMA/LPS für 15 und 30 Minuten sowie für 1, 2, 6 und 24 Stunden exponiert. Anschließend wurden die phosphorylierten MAPK und die Gesamtmenge an MAPK (phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form) mit spezifischen Antikörpern mittels Western Blot nachgewiesen. Als Maß der Aktivierung der MAPK wurde das Verhältnis der phosphorylierten MAPK und der Gesamt-MAPK errechnet.

Die MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK unterschieden sich sowohl in Abhängigkeit von der Expositionszeit als auch in der Stärke der Aktivierung oder Inaktivierung. ERK1/2, p38 and JNK wurden unterschiedlich stark in Anwesenheit von LPS (0.1 µg/ml), und TEGDMA (3 mM) aktiviert.

Die MAPK p38 wurde nach kurzen Expositionszeiten von 30 Minuten mit TEGDMA nur schwach um den Faktor 1,8 aktiviert, während eine Aktivierung von ERK1/2 und JNK unter gleichen Bedingungen gänzlich ausblieb. Nach einer Expositionszeit von 2 Stunden wurde p38 kaum aktiviert (Faktor 1,2). Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde durch eine zweistündige TEGDMA-Exposition inhibiert. Die MAP-Kinase JNK zeigte nach 2 Stunden Exposition keine Aktivierung oder Inaktivierung. Nach einer Expositionszeit von 6 Stunden fand sich bei p38 eine Aktivierung, die sich kaum von derjenigen nach 30 Minuten unterschied (Faktor 1,9 im Vergleich zu Faktor 1,8). Exponierte man Zellen jedoch für 24 Stunden TEGDMA, so zeigte sich ein enormer Anstieg der Aktivierung von p38 um den Faktor 15,1. ERK1/2 verhielt sich ähnlich. Auch hier wurde nach 6 Stunden keine nennenswerte Phosphorylierung beobachtet, jedoch wurde nach 24 Stunden auch eine Steigerung um den Faktor 15,1 erzielt. Die SAPK JNK wurde nach 6 Stunden Exposition gegen TEGDMA ebenfalls nicht aktiviert (Faktor 0,8). Im Unterschied zu p38 und ERK1/2 fand sich aber bei JNK nach 24 Stunden Exposition nur eine geringe Aktivierung um den Faktor 1,3.

Analysen zur Induktion von Apoptose durch TEGDMA, die parallel zu den Nachweisen der MAPK durchgeführt wurden, zeigten einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 und der TEGDMA-induzierten Apoptose. Hierbei stieg die Zahl der Makrophagen, die in Apoptose und Nekrose übergingen prozentual mit der Expositionszeit. Damit wurde eine Korrelation, wenn auch kein

kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivierung von MAPK und der Induktion von Apoptose durch TEGDMA gefunden.

Die Genotoxizität sowie die Zytotoxizität des Monomers TEGDMA aber auch von HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) in verschiedenen Zelllinien wurden durch frühere Arbeiten häufig nachgewiesen. Mit der Charakterisierung der Kinetik der Aktivierung von MAPK und der Korrelation zur Induktion von Apoptose in der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Schritt zur Erklärung von Mechanismen der biologischen Wirkung dentaler Monomere geleistet. Es gilt nun den noch fehlenden kausalen Zusammenhang durch geeignete Forschungsansätze wie beispielsweise mittels pharmakologischer und genetischer Inhibitoren der hier diskutierten MAPK zu untersuchen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol*, 2001, 166:3837-45.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000; 18:767-811

Beutler B. Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol*, 2004, 4:498.

Blattner C, Knebel A, Radler-Pohl A, Sachsenmaier C, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes. *Environ Mol Mutagen*, 1994, 24:3-10.

Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, *et al.* The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand*, 2000a, 58:217-28.

Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, *et al.* Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci*, 2000b, 108:59-69.

Cuadrado A, Lafarga V, Cheung PC, Dolado I, Llanos S, Cohen P, Nebreda AR. A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J*, 2007, 26:2115-26.

Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater*, 2008, 24:362-71.

Deshpande VS, Kehrer JP. Mechanisms of N-acetylcysteine-driven enhancement of MK886-induced apoptosis. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22:303-11.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20:55-72.

A. Eckhardt, T. Harorli, J. Limtanyakul, K.-A. Hiller, C. Bosl, C. Bolay, F.X. Reichl, G. Schmalz, H. Schweikl. Inhibition of cytokines and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 2009, 30:1665-74.

Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, *et al.* Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 2004, 25:4573-80

Engelmann J, Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W. ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005, 75:272-6.

Gaestel M. Molecular chaperones in signal transduction. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, 172:93-109.

- Galán A, García-Bermejo ML, Troyano A, Vilaboa NE, de Blas E, Kazanietz MG, Aller P. Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem*, 2000, 275:11418-24.
- Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent*, 1996, 24:125-8.
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*, 1998, 41:474-80.
- Geurtsen W, Spahl W, Müller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J Biomed Mater Res*, 1999, 48:772-7.
- Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2000, 11:333-55.
- Geurtsen W. Toxicology of dental materials and 'clinical experience'. *J Dent Res*, 2003, 82:500.
- Golding, -S-E; Rosenberg, -E; Neill, -S; Dent, -P; Povirk, -L-F; Valerie, -K Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer-Res*, 2007, 67:1046-53.
- Gough JE, Downes S. Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res*, 2001, 57:497-505.
- Gough JE, Scotchford CA, Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61:121-30.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, and Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H2O2. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, 1996, 271:4138-42.
- Hai T, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*, 2001, 273:1-11.
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, 1991, 70:1450-5.
- Hayakawa T, Matsuzawa A, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect*, 2006, 8:1098-107.
- Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1996, 7:172-9.
- Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 2003, 82:814-8.
- Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.*, 2008, 22:954-65.
- Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773:1161-76.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26:239-57.

Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, Watanabe A, Nukiwa T. Suppressive mechanism of clarithromycin on lipopolysaccharide-induced IL-8 production in human monocytes by mediating AP-1 and NF-kappaB. *Jpn J Antibiot*, 2003, 56:100-5.

Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*, 2010, 31:2964-75.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, *et al.* Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 2009, 16:3-11.

Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G, Pouyssegur J. A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res*, 1996, 2:49-58.

Lee SH, Lee JG, Kim JR, Baek SH. Toll-like receptor 9-mediated cytosolic phospholipase A2 activation regulates expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364:996-1001.

Lu D, Chen J, Hai T. The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J*, 2007, 401:559-67.

Huang X, Li X, Guo B. KLF6 Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells through Up-regulation of ATF3. *J Biol Chem*, 2008, 283:29795-801.

Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe KI. Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J*, 2001, 15:2025-6.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995, 146:3-15.

Matsuzawa A, Nishitoh H, Tobiume K, Takeda K, Ichijo H. Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4:415-25.

Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid-Redox-Signal*, 2005, 7: 472-81

Michelsen VB, Lygre H, Skålevik R, Tveit AB, Solheim E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 2003, 111:263-71.

Michelsen VB, Moe G, Skålevik R, Jensen E, Lygre H. Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007, 850:83-91.

Morita K, Saitoh M, Tobiume K, Matsuura H, Enomoto S, Nishitoh H, and Ichijo H. Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J*, 2001, 20:6028-36.

- Morton S, Davis RJ, Cohen P. Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett*, 2004, 572:177-83.
- Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31:268-75.
- Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13:509-20.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science*, 2003, 299:214-5.
- Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res*, 2002, 81:265-9.
- Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkmann KR, Kaga M, Sano H. Sublethal, 2-week exposures of dental material components alter TNFalpha secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater*, 2003, 19:101-5.
- Paranjpe A, Sung EC, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A.J. N-acetyl cysteine protects pulp cells from resin toxins in vivo. *Dent Res*, 2008, 87:537-41.
- Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetyl cysteine mediates protection from 2-hydroxyethyl methacrylate induced apoptosis via nuclear factor kappa B-dependent and independent pathways: potential involvement of JNK. *Toxicol Sci*, 2009, 108:356-66.
- Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem*, 2000, 275:35778-85.
- Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci*, 1997, 105:97-116.
- Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J*, 2002, 35:47-55.
- Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*, 2007, 11:175-89.
- Rueggeberg FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent*, 2002, 87:364-79.
- Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, Zhang H, Nishitoh H, Ichijo H, Saeki K, Isemura M, Yuo A. Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J*, 2002, 368:705-20.
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, and Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signalregulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*, 1998, 17:2596-2606.

Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater*, 2007, 23:34-9.

Schmalz G. Materials science: biological aspects. *J Dent Res*, 2002, 81:660-3.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 1982, 2:229-59.

Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 1997, 17:5588-97.

Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials*, 2005, 26:4111-8.

Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, *et al.* Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials*, 2005a, 26:1713-9.

Schweikl H, Altmannberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, *et al.* The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials*, 2005b, 26:4111-8.

Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, *et al.* Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater*, 2007;23:688-95.

Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, *et al.* Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 2008, 29:1377- 87.

Schweikl H. Molekulare Toxikologie von Monomeren zahnärztlicher Komposite. Forschungsbericht. Universität Regensburg. <http://epub.uni-regensburg.de>, 2009.

Sefton BM. Overview of protein phosphorylation. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001, 14:14.1.

Seminara AR, Ruvo PP, Murad F. LPS/IFN γ -induced RAW 264.7 apoptosis is regulated by both nitric oxide-dependent and -independent pathways involving JNK and the Bcl-2 family. *Cell Cycle*, 2007, 6:1772-8.

Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res*, 2004, 83:703-7.

Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res*, 2004a, 83:703-7.

Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paterno R, Schweikl H. NF- κ B protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res*, 2004b, 83:837-42.

Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res*, 2004c, 83:703-7.

- Spagnuolo G, D'Antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials*, 2006, 27:1803-9.
- Spagnuolo G, D'Antò V, Valletta R, Strisciuglio C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT. *J Endod*, 2008, 34:684-8.
- Stanislawski L, Lefevre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res*, 2003, A 66:476-82.
- Takeda K, Noguchi T, Naguro I, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48:199-225.
- Takeuchi K, Motoda Y, Ito F. Role of transcription factor activator protein 1 (AP1) in epidermal growth factor-mediated protection against apoptosis induced by a DNA-damaging agent. *FEBS J*, 2006, 273:3743-55.
- Tang F, Tang G, Xiang J, Dai Q, Rosner MR, Lin A. The absence of NF-kappaB-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2002, 22:8571-9.
- Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem*, 2002, 277:12710-7.
- Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*, 2002, 18:318-23.
- Tong Z, Singh G, Rainbow AJ. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res*, 2002, 62:5528-35.
- Tibbles LA and Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55:1230-54.
- Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2001, 2:222-8.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57:145-55.
- Ulevitch RJ. Molecular mechanisms of innate immunity. *Immunol Res*, 2000, 21:49-54.
- Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 2004, 49:125-31.
- Watson WH, Chen Y, Jones DP. Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors*, 2003, 17:307-14.
- Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R. Siloranes in dental composites. *Dent Mater*, 2005, 21:68-74.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 2004, 134:489-92.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF alpha. *Blood*, 2000, 95:3823-31.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardó M, Herrero C, Soler C, Lloberas J, Celada A. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology*, 2001, 204:543-50.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 1995, 270:1326-31.

Yamada M, Kojima N, Paranjpe A, Att W, Aita H, Jewett A, Ogawa T. N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. *J Dent Res*, 2008, 87:372-7.

Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, Ronchi AE, Rocchetti M, Mingozi F, Foti M, Chirico G, Costa B, Zaza A, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature*, 2009, 460:264-8.

Zhao Y, Xue Y, Oberley TD, Kiningham KK, Lin SM, Yen HC, Majima H, Hines J, St. Clair D. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Res*, 2001, 61: 6082-8.

Zhivotovsky B. Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle*, 2004, 3:64-6.

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Helmut Schweikl danke ich für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit. Seine Ideen und Vorschläge sowie seine fachliche Kompetenz trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei. Dabei bedanke ich mich nicht zuletzt für die stets angenehme und humorvolle Atmosphäre bei den unzähligen Besprechungen.

Dem Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Herrn Prof. Dr. G. Schmalz danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Christine Petzel für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und die angenehme Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Forschungsbereichs der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie danke ich für die stets angenehme und hilfsbereite Atmosphäre.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Eva-Maria Frank
Geburtsdatum: Juni 1980
Geburtsort: Regensburg

Bildungsweg

Assistenzzeit

03/2010 – laufend

Zahnarztpraxis Dr. med. dent. Hubert Hümmer,
Regensburg

Approbation

12/2009

Regierung von Oberbayern

Hochschule

07/2009 – 11/2009

Staatsexamen Zahnmedizin,
Universitätsklinikum Regensburg

07/2008

Beginn der Doktorarbeit bei Prof.Dr.Dr. H.Schweikl
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Thema: „Die Wirkung eines dentalen Monomers auf
die Expression von MAP-Kinasen“)

04/2007

Zahnärztliche Vorprüfung

04/2005

Naturwissenschaftliche Vorprüfung

04/2004 -07/2009

Studium der Zahnmedizin,
Universitätsklinikum Regensburg

Berufliche Ausbildung

02/2004

Gesellenprüfung im Zahntechniker-Handwerk,
Handwerkskammer Niederbayern-Oberpfalz

01/2001 -02/2004

Frank Dentaltechnik GmbH, Regensburg

Schule

09/2000 – 12/2000

Sprachschule in Boston, USA

09/1991 – 06/2000

Albrecht-Altdorfer-Gymnasium, Regensburg

09/1987 – 07/1991

Grundschule Laaber

